



Aus der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med Christian Hagl

Labor für Tissue Engineering

**Etablierung einer neuen Methode zur bioreaktorgestützten Entwicklung
von
„Tissue Engineered Vascular Grafts“**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie (Dr. rer. biol. hum.)

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Julia Schulte

aus

Paderborn

Jahr

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Peter Überfuhr

Mitberichterstatter: Prof. Dr. Matthias Schieker

Prof. Dr. Andreas Dendorfer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dr.-Ing. Bassil Akra

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 01.08.2017



Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	6
2	Einleitung.....	8
2.1	Das menschliche Gefäßsystem.....	8
2.1.1	Physiologischer Aufbau des menschlichen Gefäßsystems.....	8
2.1.2	Pathologie von Gefäßen und die Behandlung von Gefäßkrankheiten.....	9
2.1.3	Anforderungen an einen optimalen Gefäßersatz	11
2.2	Tissue Engineering von Gefäßersatz	12
2.2.1	Scaffoldmaterialien, Zellen und Bioreaktoren	13
2.3	Zielvorstellung	16
3	Material und Methoden	18
3.1	Gefäßscaffolds.....	18
3.1.1	Polyurethan.....	18
3.1.2	Collagen.....	19
3.1.3	Humane dezellularisierte Venen.....	19
3.1.4	Bakterielle Cellulose.....	20
3.2	Zellen	20
3.2.1	Zellisolation	20
3.2.2	Zellkultivierung	22
3.2.3	Zellzählung.....	23
3.3	Bioreaktor.....	24
3.3.1	Aufbau des Bioreaktors	24
3.3.2	Umbau zur Optimierung des Bioreaktors.....	25
3.3.3	Sterilisation des Bioreaktors	25
3.3.4	Druckmessung im Bioreaktor	26
3.3.5	Besiedlung verschiedener Scaffoldmaterialien	26
3.3.6	Besiedlung im Bioreaktor	27
3.3.7	Besiedlung und Konditionierung im Bioreaktor	28
3.4	Auswertungsmethoden.....	30

3.4.1	Immunfärbung	30
3.4.2	Rasterelektronenmikroskopie	37
3.4.3	RNA-Expressionsuntersuchung	38
4	Ergebnisse.....	40
4.1	Untersuchung der Scaffoldmaterialien.....	40
4.1.1	Rasterelektronenmikroskopie	40
4.1.2	Immunhistochemie	42
4.2	Qualifizierung der Zellen	42
4.3	Umbaumaßnahmen am Bioreaktor.....	43
4.3.1	Sterilität	44
4.3.2	Parallele Besiedlung von zwei TEVGs	45
4.3.3	Dynamische Besiedlungsbedingungen.....	46
4.3.4	Konditionierung der TEVGs und Austausch der Pumpe	47
4.3.5	Vereinfachtes Handling	49
4.4	Besiedlungsversuche ohne Fluss	50
4.4.1	Polyurethan.....	50
4.4.2	Collagen.....	52
4.4.3	Humane dezellularisierte Venen.....	53
4.4.4	Bakterielle Cellulose.....	54
4.5	Etablierung des Perfusionsprotokolls	55
4.6	Flussversuche mit dem Bioreaktor	58
4.6.1	Rasterelektronenmikroskopie	58
4.6.2	Immunhistochemie	60
4.6.3	RNA-Expressionsuntersuchung	67
4.7	Zusammenfassung.....	68
5	Diskussion.....	69
5.1	Prozessentwicklung zur Verwendung des Bioreaktors	69
5.2	Potential des „all-in-one“-BR für die kommerzielle Herstellung von TEVG.....	71
5.3	Besiedlungserfolg und Eigenschaften der einzelnen Scaffoldmaterialien	72
6	Ausblick	76

I.	Abkürzungsverzeichnis	77
II.	Abbildungsverzeichnis	79
III.	Tabellenverzeichnis.....	84
IV.	Literaturverzeichnis.....	85
7	Eidesstattliche Versicherung	92
8	Lebenslauf	93
9	Danksagung.....	94
10	Vorveröffentlichung:.....	96

1 Zusammenfassung

Hintergrund und Ziel der Arbeit: Der Bedarf an Prothesen zur Verwendung als Bypassmaterial steigt mit zunehmender Alterung unserer Gesellschaft. Die gängigen Bypassprothesen zur Revaskularisierung nach Herzinfarkt sind innere Brustarterien oder Venen des Patienten. Diese haben jedoch verschiedene Limitationen. Die Gefäße können mit der Zeit degenerieren und es können sich beispielsweise Aneurysma oder erneute Verschlüsse bilden, so dass die Suche nach idealen Gefäßprothesen weiterhin relevant ist. Die Entwicklung von Gefäßersatz auf Basis verschiedener Gerüstmaterialien und patienteneigener Zellen ist Ziel dieser vorliegenden Arbeit gewesen. Hierzu wurde ein Bioreaktor-Prototyp, welcher in der eigenen Arbeitsgruppe zuvor im Rahmen einer Diplomarbeit der medizintechnischen Fakultät der TU München von Anja Friedrich entwickelt wurde verwendet. Es erfolgte die Validierung des Reaktors, welcher nach Bedarf umgebaut wurde und die Entwicklung eines Besiedlungs- und Konditionierungsprotokoll. Die generierten Gefäßprothesen wurden molekularbiologisch untersucht.

Material und Methoden: Im Rahmen der Bioreaktor-Validierung wurden das Handling und die Dichtigkeit des Reaktors verbessert und die Sterilität durch Sichtkontrolle und mikrobiologische Untersuchungen des Kulturmediums überprüft. Die suffiziente Zahl von $7,5 \times 10^5$ Zellen/ cm² (Fibroblasten und Endothelzellen aus der *vena saphena magna*) zur Besiedlung der Gerüstmaterialien wurde auf Basis eigener empirischer Forschung sowie auf Grundlage von Literaturrecherche ermittelt. Ebenso wurden die Zellen mit sukzessiv steigenden Scherkräften von 10 bis 40 dyn/ cm² konditioniert und eine vollständige Besiedlung der Scaffoldmaterialien innerhalb von lediglich 6 Tagen ermöglicht. Verschiedene Trägermaterialien (Polyurethan, Collagen, dezellularisierte Venen und bakterielle Cellulose) wurden schließlich mit dem etablierten Protokoll besiedelt und, abgesehen von dezellularisierten Venen, mit denen die Besiedlung nicht möglich war, konditioniert. Anschließend erfolgte die vergleichende Auswertung der besiedelten Scaffolds mittels Rasterelektronenmikroskopie, Immunhistochemie und rt-PCR.

Ergebnisse: Die Etablierung eines einfachen Protokolls, das die Herstellung einer Gefäßprothese innerhalb von 3 Wochen nach Entnahme der Spenderzellen ermöglicht, wurde nach Anpassungen am Bioreaktor erfolgreich umgesetzt. Die Verbesserungen umfassten das Hinzufügen zahlreicher Adapter und neuer Schläuche, um die Dichtigkeit des Bioreaktors zu gewährleisten und das Befüllen zu vereinfachen. Außerdem wurde die Rotation des Besiedlungszylinders durch einen zusätzlichen Keilriemen zum Antrieb der hinteren Walze des Mixers gesichert. Die ursprünglich verwendete Pumpe wurde gegen ein Modell ausgetauscht,

welches nach der Adhäsion der Zellen eine anschließende Konditionierung erlaubte. Dies war mit der initial verwendeten Pumpe durch eine zu starke Pumpleistung nicht möglich.

Mittels rasterelektronischer Mikroskopie konnte nachgewiesen werden, dass die verwendeten dezellularisierten Venen nicht für eine Besiedlung mit primären Fibroblasten und Endothelzellen geeignet war. Bei den übrigen Materialien Polyurethan, Collagen und bakterieller Cellulose wurden mit dem etablierten Besiedlungs- und Konditionierungsprogramm jedoch geschlossene Zellrasen und damit gute Besiedlungserfolge nachgewiesen.

Die immunhistochemischen Untersuchungen und RNA-Analysen zeigten darüber hinaus, dass bakterielle Cellulose und Polyurethan die vielversprechendsten der getesteten Materialien für die Entwicklung von besiedelten und konditionierten Gefäßprothesen darstellen. Unterschiede in der Aktivierung der Zellen auf den Materialien wurden durch die Expression von ASMA und Fibronectin deutlich. Auf bakterieller Cellulose und Polyurethan fiel diese im Gegensatz zu Zellen auf Collagen vergleichsweise gering aus. Collagen IV hingegen wird besonders stark von Zellen auf bakterieller Cellulose und Polyurethan exprimiert und weist auf die Ausbildung einer Basalmembran hin. Die erhöhte Expression von IL-1 α in auf Collagen kultivierten Zelle deutet auf eine verstärkte Synthese von Collagenasen hin und erklärt so die Degradation des Materials im Verlauf der Kultivierung.

Schließlich sind insbesondere die bakterielle Cellulose und Polyurethan in der chirurgischen Handhabbarkeit gut geeignet was für den Einsatz beim Patienten essentiell ist.

Ausblick: Für eine routinemäßige Verwendung des Bioreaktors zur Generierung von Gefäßprothesen „at the bedside“ für die klinische Anwendung sollte im Folgenden die Besiedlungseinheit des Bioreaktors als Einwegmaterial entwickelt werden. Darüber hinaus sollte die Erforschung der bakteriellen Cellulose weiter vorangetrieben werden, da diese sich als äußerst interessantes nicht degradables Material erwiesen hat.

2 Einleitung

Im Jahr 2012 belegten ischämische Herzkrankheiten und Schlaganfälle die ersten beiden Plätze der 10 häufigsten Todesursachen weltweit mit insgesamt 24,1 % [1]. Arteriosklerose und ein daraus resultierender Gefäßverschluss wird als maßgebliche Ursache für die Krankheiten genannt.

Eine Möglichkeit zur Behandlung des drohenden Gefäßverschlusses ist die Implantation einer Gefäßprothese zur Überbrückung der erkrankten Stelle [2]. Explantierte patienteneigene Gefäße weisen verschiedene Nachteile und Limitationen auf wie zum Beispiel eine 50%-ige Wahrscheinlichkeit für eine Re-Stenose innerhalb von 10 Jahren postoperativ [3]. Großlumige Röhren aus Kunststoffen wie expandiertem Polytetrafluorethylen (ePTFE) sind nur bei einem Durchmesser größer als 6 mm funktional und werden somit am Herzen lediglich an der Aorta eingesetzt. Deshalb werden intensive Bemühungen zur Entwicklung optimaler Gefäßprothesen unternommen. Bioreaktorgestützte Konzepte gewinnen dabei zunehmend an Bedeutung.

2.1 Das menschliche Gefäßsystem

2.1.1 Physiologischer Aufbau des menschlichen Gefäßsystems

Gefäße bestehen aus 3 verschiedenen Schichten, denen unterschiedliche Aufgaben zukommen.

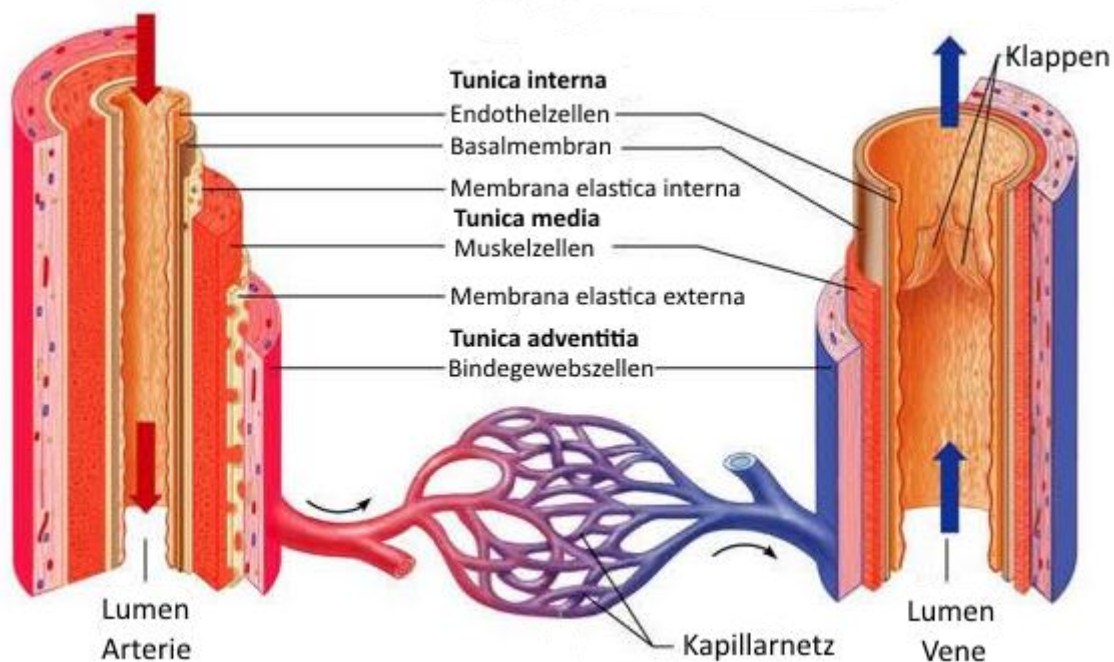


Abbildung 2-1: Darstellung des Aufbaus von Gefäßen (modifiziert nach [4])

Die *Tunica interna* kleidet das Gefäß aus und besteht aus Endothelzellen und einer Basalmembran. Die intakte Endothelzellschicht sorgt u. a. für einen reibungslosen Blutstrom durch das Gefäß. In Arterien trennt eine *Membrana elastica interna* die *Tunica interna* von der *Tunica media*. Diese besteht aus einer ausgeprägten Muskelschicht, die auf beiden Seiten von elastischem Bindegewebe umgeben ist. In herznahen Gefäßen ist der Anteil des elastischen Bindegewebes ausgeprägter, während distale Gefäße verstärkt Muskelzellen aufweisen. Wiederum werden *Tunica media* und die nachfolgende *Tunica adventitia* in Arterien durch eine Membran, die *Membrana elastica externa*, voneinander getrennt. Die äußere Schicht des Blutgefäßes besteht aus lockerem Bindegewebe und dient der Verankerung und Einbettung des Blutgefäßes in seine Umgebung. Große Blutgefäße sind darüber hinaus von feinen Gefäßen zur Versorgung der Gefäßwand umgeben, während bei kleinen Blutgefäßen die Versorgung der Zellen aus dem Lumen der Gefäße selbst heraus erfolgt. [5]

Venen weisen im Gegensatz zu Arterien Venenklappen auf, die einen Rückstrom des Blutes verhindern und besitzen dünnere Gefäßwände durch eine weniger stark ausgeprägte Muskelzellschicht.

Gefäße können während der Embryonalentwicklung durch Vaskulogenese entstehen, sowie auch im adulten Organismus, durch Angiogenese. Die Angiogenese geht zum Teil mit pathologischen Vorgängen, beispielsweise beim Krebswachstum, einher [6].

2.1.2 Pathologie von Gefäßen und die Behandlung von Gefäßkrankheiten

Die häufigste Ursache für Gefäßleiden ist die Arteriosklerose, die meist jahrelang symptomfrei bleibt und sich erst im Endstadium bemerkbar macht.

Zur Entstehung der Arteriosklerose gibt es verschiedene Erklärungsansätze.

Die „*Response to injury*“-Hypothese setzt als einleitendes Ereignis die Schädigung des Endothels voraus. Diese führt zu einer endothelialen Dysfunktion und den Verlust der antithrombotischen Eigenschaften. Die Ausbildung von Adhäsionsmolekülen wie Selektinen, ICAM (engl.: *Intercellular Adhesion Molecule*) und VCAM (engl.: *Vascular Cell Adhesion Molecule*) ermöglicht das Anheften von Blutzellen an die Gefäßwand und die Migration von T-Lymphozyten und Monozyten in das geschädigte Endothel hinein. Die Zellen reichern sich dann im subendothelialen Bereich an.

Bei der „Lipidhypothese“ (vgl. Abbildung 2-2) wird postuliert, dass die Einwanderung von Monozyten durch Chemotaxis ausgelöst wird (Abbildung 2-2, Abschnitt 1), wobei insbesondere MCP-1 (engl.: *Monocyte Chemoattractant Protein-1*) sowie LDL (engl.: *Low-Density-Lipoprotein*) als Attraktants genannt werden. Die eingewanderten Monozyten differenzieren dann im Subendothelialraum zu Makrophagen und werden durch ungehemmte Aufnahme von LDL zu sogenannten Schaumzellen. Hierdurch wird eine Entzündungsreaktion angestoßen, welche die Bildung weiterer Adhäsionsmoleküle und die fortlaufende Aufnahme

von Immunzellen induziert. Proliferierende glatte Muskelzellen der *Media* verdicken die Gefäßwand zusätzlich.

Die Ausbildung einer bindegewebsartigen Kappe über dem lädierten Gefäßabschnitt führt zur Ausbildung des Fibroatheroms, welches durch die kollagenöse Deckplatte den arteriosklerotischen Plaque vom zirkulierenden Blut trennt und im Patienten für mehrere Jahre unbemerkt bestehen kann (Abbildung 2-2, Abschnitt 2). Im Laufe der Zeit kann das schützende Bindegewebe jedoch abnehmen. Die im Plaque befindlichen Makrophagen können proteolytische Enzyme freisetzen und so den stabilen Plaque in einen instabilen Zustand überführen (Abbildung 2-2, Abschnitt 3). Durch zusätzliche Scherkräfte an der verdickten Stelle kann schließlich eine Plaqueruptur erfolgen.

Innerhalb von Minuten wird das Hämostasesystem an der Einrissstelle aktiviert (Abbildung 2-2, Abschnitt 4) und ein intravaskulärer Thrombus kann zum vollständigen Verschluss des Gefäßes und somit zum Beispiel zum Infarkt führen.

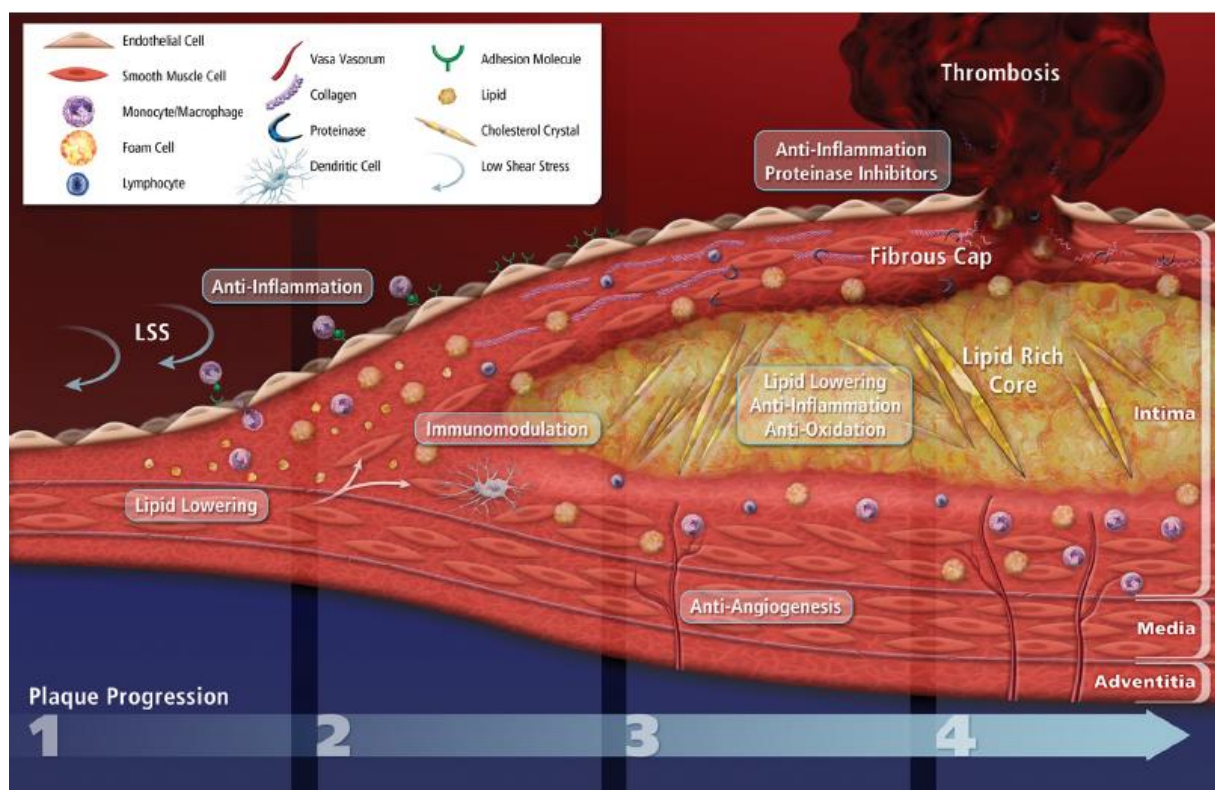


Abbildung 2-2: Darstellung einer fortschreitenden Arteriosklerose in 4 Schritten nach [7].

Die Marburger Hypothese [8] verbindet diese beiden Theorien der Entstehung von Arteriosklerose und liefert so auch eine Erklärung für die bevorzugte Entstehung von Plaques in den Herzkranzgefäßen und die Entstehung einer generalisierten Arteriosklerose bei Diabetikern.

Knapp zusammengefasst ist das Herz Opfer seines hohen Stoffwechsels, da es seinen Energiebedarf zu etwa 70 % durch Fettsäuren deckt. Diese Fettsäuren können eine

endotheliale Apoptose triggern, was einer Verletzung des Endothels entspricht und so die Kaskade bis zum (Myokard-)Infarkt einleitet. Die Gefahr der Plaqueruptur wird durch die apoptotische Wirkung der Fettsäuren auf die Endothelzellen verstärkt.

Die Strategie bei der Behandlung sieht zunächst vor die Risikofaktoren der Patienten, unter anderem mit Medikamenten, zu senken. Sollten die Medikamente nicht mehr ausreichend helfen, wird ein interventioneller Eingriff notwendig, bei dem entweder eine kathetergestützte Aufweitung des Gefäßes mit möglicher Stentimplantation erfolgt oder die stenosierte Gefäße mit Prothesen überbrückt werden [9].

Im Jahr 2000 erfolgten allein in Deutschland rund 73.000 Bypassoperationen [9] und in den USA wurden sogar über eine Million arterielle Ersatzoperationen durchgeführt [10]. Die Zahl der Bypassoperationen ist mittlerweile in Konkurrenz zur minimalinvasiven Methode der Stentimplantation rückläufig. Allerdings warnt die Deutsche Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie vor der voreiligen Entscheidung zur Stentimplantation, da es hierbei auf längere Sicht durch erneuten Verschluss zu häufigeren Re-Interventionen oder Re-Operationen kommt. Der Anteil der chirurgischen Revaskularisierungen wird sich voraussichtlich in Zukunft stabilisieren, da es auf der Basis der 2009 veröffentlichten SYNTAX-Studie [11] nun möglich ist, vorab die Patienten zu identifizieren, die von einem chirurgischen Eingriff im Vergleich zu perkutanen Eingriffen mit einer höheren Lebenserwartung und weniger Zwischenfällen profitieren.

2.1.3 Anforderungen an einen optimalen Gefäßersatz

Beim Gefäßersatz in Folge von Arteriosklerose, Gefäßverschluss oder Verschleiß durch regelmäßige Punktion (bei Dialysepatienten) weisen die derzeit verfügbaren Prothesen verschiedene Nachteile und Limitationen auf.

Trotz intensiver Forschungen ist noch immer die Nutzung von autologen Venen oder Arterien zur Revaskularisierung der Goldstandard in der Klinik. Hierfür werden gesunde, patienteneigene Gefäße explantiert oder transponiert und an die geschädigte Stelle verpflanzt. Die daneben verwendeten PTFE-Prothesen sind in ihrer Anwendbarkeit auf Gefäße mit einem Durchmesser von mehr als 6 mm limitiert da es bei geringerem Durchmesser verstärkt zu Re-Stenosen durch Koagulation kommt. Die Vor- und Nachteile der Gefäße beziehungsweise der PTFE-Prothesen sowie die Ansprüche an einen optimalen Gefäßersatz sind in Tabelle 2-1 aufgeführt.

Tabelle 2-1: Ansprüche an optimale Gefäßprothesen sowie Vor- und Nachteile von Homografts und ePTFE-Prothesen [12]–[16]. Die Bedingungen sind zum Teil nicht erfüllt (-), bedingt erfüllt (+) oder vollständig erfüllt (++)

Ansprüche an optimale Gefäßprothesen	Homografts	ePTFE-Prothesen
Druckresistenz	+ je nach verfügbarem Gefäß	++
Keine Bildung von Aneurysmen	+ je nach verfügbarem Gefäß	++
Keine Toxizität	++	+ Fremdmaterial
Resistenz gegen Thrombosen und Infektionen	+ bei Entnahme ohne Verletzung des Gefäßes	-
Resistenz gegen intimale Hyperplasie	+ bei Entnahme ohne Verletzung des Gefäßes	-
Chirurgische Handhabbarkeit	++	++
Hohe Lebensdauer	+ je nach verfügbarem Gefäß	+ sofern keine vorzeitige Re-Stenose auftritt
Elastizität	+	-
Compliance	+ je nach verfügbarem Gefäß	-
Geringe Herstellungskosten	++	++
Limitationen	Erfolg abhängig von: - Erfahrung des Arztes - Qualität des verfügbaren Gefäßes	Material ungeeignet bei Gefäßdurchmesser < 6 mm

Noch schwieriger sind die Ansprüche an Prothesen für den Einsatz bei Kindern zu erfüllen, da hier zusätzlich ein Mitwachsen der Prothese erwünscht ist um spätere Re-Operationen zu vermeiden. Wünschenswert wäre, dass das ursprünglich verwendete Prothesenmaterial mit der Zeit vollständig durch die körpereigenen Zellen des jungen Patienten ersetzt werden, weshalb hier vermehrt abbaubare Materialien im Fokus stehen (vgl. 2.2.1).

2.2 Tissue Engineering von Gefäßersatz

Seit der Entwicklung einer Gefäßprothese auf Basis von Collagen von Weinberg und Bell, welche allerdings ohne zusätzliche Verstärkung durch Dracon-Netze keinen starken Druckbelastungen standgehalten hat [17], wurden in den letzten Jahren von vielen Arbeitsgruppen Anstrengungen unternommen, nach den Grundsätzen des Tissue Engineering (TE) die Probleme der aktuellen Prothesen zu beheben. Bei der Entwicklung von Gefäßprothesen, die mittels TE produziert werden (TEVG, engl.: *tissue engineered vascular graft*) und die genannten Einschränkungen überwinden, wird insbesondere darauf

hingearbeitet, dass funktionale Gefäßprothesen mit einem Innendurchmesser kleiner als 6 mm etabliert werden [18]–[21].

Eine eher kleine Anzahl von Studien arbeitet ohne Hilfsstrukturen aus verschiedenen Scaffoldmaterialien. Dieses Vorgehen sorgt für eine äußerst aufwändige Herstellung, die viel Know-How benötigt und entsprechend hohe Kosten verursacht. So kultivierte L'Heureux Hautfibroblasten in Form eines flächigen Zellverbandes. Dieser wurde auf einem Stab aufgebracht, welcher nach der Fusion der Fibroblasten zur Röhre wieder entfernt wurde. Weitere Prozessierung ermöglichte eine Druckresistenz bis zu 2000 mmHg und einen erfolgreichen Einsatz im Hundemodell [14], [22].

2.2.1 Scaffoldmaterialien, Zellen und Bioreaktoren

Neben den gerüstoffreien Ansätzen zur Entwicklung des optimalen Gefäßersatzes sind verschiedenste organische und synthetische, resorbierbare und nicht resorbierbare Werkstoffe in der Verwendung [18].

Bei organischen Allo- und Xenografts besteht neben ethischen Bedenken auch die Gefahr unerwünschter Infektionen oder Abstoßungsreaktionen. Das Immunsystem des Patienten kann aber auch bei synthetischen Materialien ansprechen und darüber hinaus auch das Gerinnungssystem. Eine vorherige Beschichtung beispielsweise mit Heparin kann helfen Verschlüsse durch Gerinnungsprozesse zu verhindern [23], eine Beschichtung mit Paclitaxel kann eine Hyperplasie unterdrücken [24]. Die unterschiedlichen Beschichtungen zeigen einen positiven Effekt auf die Einsatzfähigkeit der Scaffoldmaterialien, doch meist wird die Beschichtung durch Scherstress im Blutkreislauf geschädigt [25].

2.2.1.1 Zellen zum Einsatz im Tissue Engineering

Eine andere Strategie ist die Besiedlung der Grafts mit Zellen. Zellen verschiedensten Ursprungs wie Stammzellen [26], endotheliale Vorläuferzellen [27] oder isolierte vaskuläre Zellen [28] finden hierbei Verwendung.

Stammzellen wird in verschiedenen Studien, abhängig von Ihrem Ursprung, hohes Proliferations- und Heilungspotential bescheinigt [29]–[31]. Allerdings bestehen bei der Verwendung von embryonalen Stammzellen ethische und rechtliche Bedenken, so dass ihr Einsatz im TE derzeit in Deutschland keine nennenswerte Anwendung findet. Darüber hinaus kann es zu unerwünschten Reaktionen kommen, da die Zellen Entartungspotential aufweisen, die Mechanismen zur zielgerichteten Differenzierung der Zellen noch nicht völlig verstanden sind und eine immunologische Abstoßung durch den allogenen Ursprung des Materials auftreten kann [32], [33].

Adulte Stammzellen, gewonnen beispielsweise aus dem Knochenmark oder dem Blut des Patienten, können ohne ethische Bedenken verwendet werden und sind autologen Ursprungs. Dennoch ist hier die Transdifferenzierung der Zellen nicht mit der benötigten Sicherheit und

Effizienz möglich, so dass Stammzellen bislang keine Standardoption für das TE darstellen [34].

Autologe Endothelzellen (EC, engl.: *endothelial cells*) aus einer Beinvene, zumeist der *Vena saphena magna* (VSM), sprechen weder das Immunsystem an, noch haben sie Entartungspotential. Um die Zellen zu gewinnen ist aber ein invasiver chirurgischer Eingriff notwendig, bei welchem dem Patienten gesundes vaskuläres Gewebe entnommen wird [35].

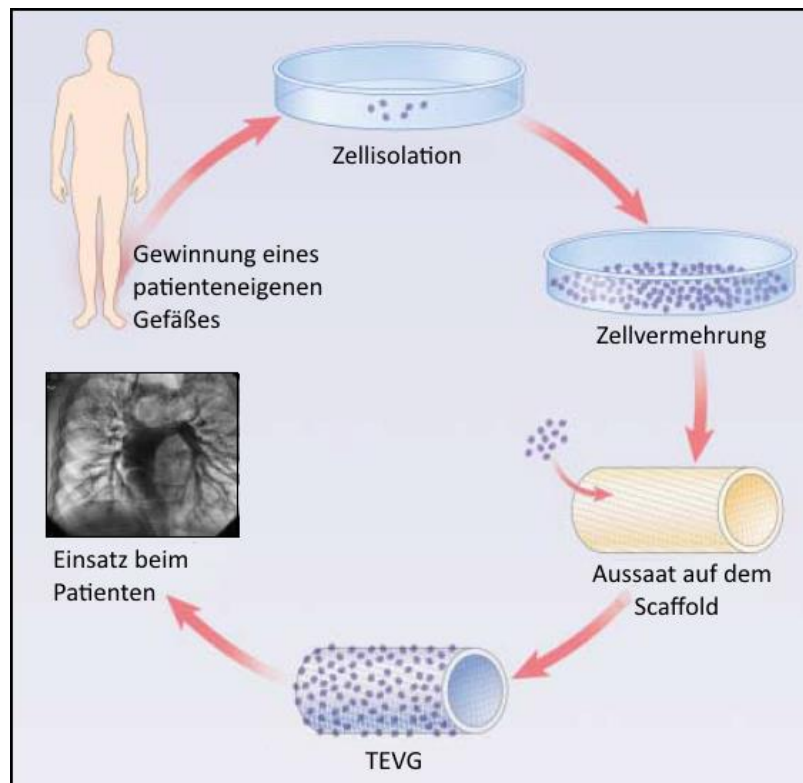


Abbildung 2-3: Ablauf der Herstellung eines TEVG. Nach Gewinnung eines patienteneigenen Gefäßes werden die Zellen isoliert, vermehrt und auf einem Scaffold aufgebracht. Das fertige TEVG kann dann dem Patienten eingesetzt werden. Abbildung modifiziert nach [36]

Es ist bekannt, dass EC durch mechanische Kräfte, wie hydrostatischen Druck oder Scherstress, in ihrem Phänotyp beeinflusst werden [37], [38]. Yazdani *et al.* konnten zeigen, dass die Konditionierung von auf dezellularisierten Venen aufgebrachten EC mittels pulsatilem Scherstress im Vergleich zu statischer Besiedlung zu einer deutlich erhöhten Resistenz des Zellmonolayers gegenüber Blutbestandteilen führte [39].

Wenn die Stimulation der Zellen zu gering ausfällt oder vollständig fehlt, führt dies zu unzureichenden Zell-Zell-Kontakten und einer eingeschränkten Fähigkeit, eine gewebeähnliche Struktur auszubilden [40], [41]. Die Zellen dedifferenzieren und es wird keine ausreichend starke extrazelluläre Matrix (ECM, engl.: *extracellular matrix*) gebildet [42]. Um die gleichen Funktionen wie natürliche Gefäße zu haben, sollte die ECM der TEVG der ECM natürlicher Gefäße möglichst ähneln [43].

Für eine weitere Stärkung der ECM und damit eine höhere Stabilität der Zell-Matrix-Interaktion, kann das Scaffold vorab mit Fibroblasten (FB) besiedelt werden. FB sind Teil von gesunden,

nativen Gefäßen und bilden darüber hinaus eine ECM, die die Verankerung der Zellen am Scaffold begünstigt [44], [45]. Auch in der hier vorliegenden Arbeit wurden EC in Kombination mit FB für die Besiedlung der Scaffolds verwendet.

2.2.1.2 Eine Auswahl von Materialien für Tissue Engineering

Das bereits in der Arbeitsgruppe zur Herstellung von Herzklappenprothesen verwendete PU [46]–[48] ist ein rein synthetischer Werkstoff und nicht abbaubar. Dies erlaubt eine standardisierte Fertigung und ein Produkt, das problemlos zu lagern ist. Die Sterilisation mittels γ -Strahlen wurde bereits von Gulbins *et al.* als überlegen gegenüber der Gassterilisation eingestuft [28] da die Adhärenz der Zellen deutlich höher war. Schließlich wird PU kommerziell als Kathetermaterial verwendet und ist somit im medizinischen Kontext bereits als unbedenklich eingestuft [49], [50].

Collagen ist ein biologisches Scaffoldmaterial, welches mit der Zeit degradiert und vollständig abgebaut werden kann. Es wurde bereits vielfach für 3D-Kulturen und TE verwendet [33], [51], [52]. Collagen I ist eines der am stärksten konservierten Proteine in Vertebraten [53], so dass auch Collagen bovinen Ursprungs in hohem Maße für den Menschen biokompatibel ist.

Die dezellularisierte humane Vene ist ein allogenes Material. Im Gegensatz zu autologen Venen muss hier eine Dezellularisierung vorgenommen werden um mögliche Immunantworten auszuschalten. Dennoch kommt es innerhalb der ersten 3 Jahre nach Implantation häufig zu erneuten Problemen mit den Allografts, kurz CAV (engl.: *Cardiac Allograft Vasculopathy*) [54], [55]. Olender *et al.* zeigten auf, dass die Revitalisierung, sprich die Besiedlung mit zumeist patienteneigenen Zellen, von dezellularisierten Allografts in vielen Geweben und insbesondere auch bei Blutgefäßen bezüglich Haltbarkeit und Akzeptanz den unbesiedelten Allografts überlegen war [56].

Bakterielle Cellulose (BC) ist ein körperfremder Stoff biologischen Ursprungs. Sie ist nicht degradabel und soll laut Herstellerangaben keine Abstoßungsreaktionen hervorrufen. BC wurde bereits in verschiedensten Forschungseinrichtungen im Bereich von TE, Wundauflagen und Drug-Delivery-Systemen verwendet [57]–[59]. Auch die Implantation des Materials als Gefäßersatz ohne vorherige Besiedlung ist im Schaf bereits erfolgreich verlaufen [60]. Bisherige Forschung beinhaltet allerdings zumeist auch die Herstellung der Cellulose innerhalb der Forschungseinrichtung und damit einhergehend eine geringe Vereinheitlichung im Herstellungsprozess. Die kommerzielle Bereitstellung von BC unter dem Handelsnamen Xellulin® ist hingegen neuartig und bietet ein weitgehend standardisiertes Produkt.

2.2.1.3 Bioreaktoren für das Tissue Engineering

Die Nutzung des eigenen Körpers als Bioreaktor (BR) zur Besiedlung einer Gefäßstruktur ist ein experimenteller Ansatz welcher von Campell *et al.* verfolgt wurde. Eine in die Peritonealhöhle eingesetzte Polymerröhre wurde innerhalb von 3 Wochen mit

hämatopoetischen Zellen der Peritonealflüssigkeit besiedelt. Nach der Entfernung aus der Bauchhöhle war das resultierende Gefäß bis 2500 mmHg druckstabil und zeigte im Hundemodell bei autologer Implantation in die Femoralarterie gute Offenheitsraten [61].

Ein weitaus größerer Anteil der Forschergruppen bedient sich allerdings eines BR zur *in vitro*-Herstellung von TEVG [10], [61]–[65].

Hierbei fordern Martin *et al.* für eine realistische Anwendung von BR im custom-made Tissue Engineering einen in hohem Maße „selbstständigen“ BR. Prothesen sollen in einem geschlossenen System unter Beobachtung verschiedener Parameter wie CO₂, Nährstoffe und Wachstumsfaktoren, unter einheitlichen Bedingungen und den Richtlinien der guten Herstellungspraxis (GMP, engl.: *Good Manufacturing Practice*) produziert werden [66]. So können sowohl Ergebnisse leicht reproduziert als auch die Kosten für eine routinemäßige Produktion von (Gefäß-)Prothesen gering gehalten werden.

Unter Betrachtung der notwendigen Bedingungen zur Entwicklung von Zell-basierten Prothesen wurden verschiedenste BR entwickelt. Hierbei werden u.a. Temperatur, Medium-/ Blutfluss, Scherstress und mechanischer Stress auf physiologische Gegebenheiten angepasst. Diese Systeme spielen eine entscheidende Rolle bei der Konstruktion von künstlich erzeugtem Gewebeersatz [67]. Sie können ebenso für die Besiedlung und Konditionierung eingesetzt werden, wie für mechanische Stresstests unter physiologischen Bedingungen [68].

Bislang haben nur wenige Forschergruppen BR entwickelt, die simultan eine dynamische Besiedlung und einen pulsatilen Fluss erlauben und darüber hinaus mehrere TEVG parallel prozessieren können [69]–[76].

2.3 Zielvorstellung

Auch wenn bereits eine Vielzahl von Ansätzen zur Entwicklung von Gefäßersatz existiert, fehlt es immer noch an bedienungsfreundlichen Prozessen, die sich potentiell auch im industriellen Maßstab verwenden ließen. Ein im Labor für Tissue Engineering (Herzchirurgische Klinik und Poliklinik der Universität München) im Rahmen einer Diplomarbeit entwickelter BR [77] wurde nach den Vorgaben der einfachen Bedienbarkeit, der Möglichkeit zur Verwendung im Inkubator und maximalen Kosten in Höhe von 400 € zur Herstellung des BR konzipiert.

Ziel der nun vorgelegten Arbeit ist es, den BR-Prototyp einem Praxistest zu unterziehen und so eine neue Methode zur Generierung von Gefäßprothesen zu entwickeln. Darüber hinaus werden verschiedene Ausgangsstoffe als Gerüstmaterial getestet. Hierzu sollen folgende Einzelaspekte bearbeitet werden:

1. Röhren aus Polyurethan, Collagen und bakterieller Cellulose sowie dezellularisierte humane Venen werden im BR ohne Perfusion mit primären humanen FB und EC aus

der *Vena saphena magna* besiedelt und mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) untersucht.

2. Anhand des am zuverlässigsten besiedelten Materials werden die Einstellungsparameter des BR, Besiedlungszeiten und erforderliche Zellzahlen für die Besiedlung bestimmt. Auch hier erfolgt die Auswertung mit Hilfe der REM.
3. Nach erfolgreicher Etablierung eines Besiedlungs- und Konditionierungsprozesses werden die erfolgreich besiedelten Materialien nach dem entsprechenden Protokoll besiedelt und der Besiedlungserfolg und die Zellantwort mittels REM, Immunhistochemie (IHC) und rt-PCR (quantitative Polymerasekettenreaktion, engl.: *real-time polymerase chain reaction*) ausgewertet.
 - a. Die REM dient der Untersuchung des Besiedlungserfolges und der Morphologie der resultierenden Zellschicht.
 - b. Die Verteilung von FB und EC sowie eine Reorganisation / Besiedelung des Trägermaterials im Sinne eines physiologischen Wandaufbaues werden durch die Untersuchung der Proteine TE7, CD31, Collagen IV, Fibronectin, glattmuskuläres α Aktin, SMC-Myosin, VE-Cadherin und ICAM überprüft. Hierfür werden die Proben sowohl als Paraffin- als auch als Kryoschnitte untersucht um verschiedene Auswertungsmethoden zu testen.
 - c. Mit der rt-PCR soll darüber hinaus eine weitere Methode verwendet und Ergebnisse aus der IHC im biologischen Zusammenhang überprüft werden. Die Marker IL-1 α , IL-6, IL-8, MCP-1 und VCAM werden herangezogen um die Zellantwort auf die Trägermaterialien und die Konditionierung zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Gefäßscaffolds

3.1.1 Polyurethan

PU ist ein Kunststoffpolymer das von der ITV-Denkendorf nach einem patentierten Verfahren (Patentnummer US 4474630A: [78]; auch DE 2806030C2) als elastische Röhre (Abbildung 3-1) produziert werden kann.

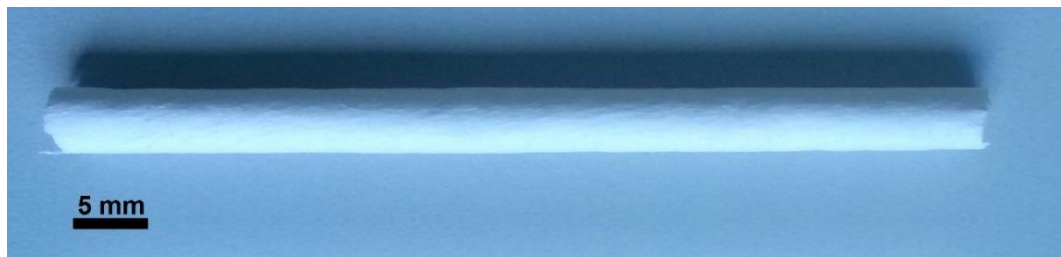


Abbildung 3-1: Polyurethan-Röhre mit 25 Schichten PU

Das PU mit der Handelsbezeichnung Vasomer® wurde in Chloroform gelöst und als Polymerlösung unter Druckluft mit einer Sprühvorrichtung auf einen rotierenden und schwenkbaren Stab aufgebracht, wobei die Fasern miteinander verkleben (Abbildung 3-2). Die Eigenschaften der produzierten Röhre hingen von der Zusammensetzung der Polymerlösung, dem verwendeten Druck, der Ausrichtung und der Rotationsgeschwindigkeit des Stabes sowie der Menge an verwendetem Polymer ab. Nachdem das Lösungsmittel abgedampft war, konnte die Prothese vom Stab entfernt werden.

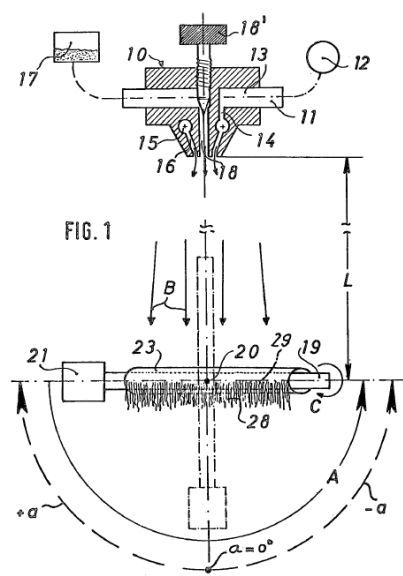


Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Sprühvorrichtung, mit Reservoir mit Polymerlösung (17), dem Sprühkopf (10 - 18), dem beweglichen Stab (19) mit Motoren für die Rotation der Längsachse (21) und Schwenken um den Mittelpunkt (20) des Stabes. Entnommen aus dem Patent US 4474630A [78].

Die Fasern der hier verwendeten Prothesen hatten einen Durchmesser von durchschnittlich 1,55 μm . Im Verlauf der Versuche wurde die Anzahl der PU-Schichten von 80 auf 25 Schichten angepasst. Die Röhren hatten eine Länge von 8 cm und einen Durchmesser von 6 mm. Für den Einsatz zur Besiedlung mit Zellen wurde das PU mit 10 kGy gamma-sterilisiert.

3.1.2 Collagen

Die Firma Viscofan Bioengineering (Weinheim, Deutschland) stellt sowohl „*Collagen Cell Carrier*“ (CCC) aus unvernetztem Collagen Typ 1 bovinen Ursprungs her [79] als auch Röhren auf Basis von Collagen Typ 1 (Abbildung 3-3). Die Röhren haben einen Innendurchmesser von 3,5 mm und eine Länge von 80 mm.

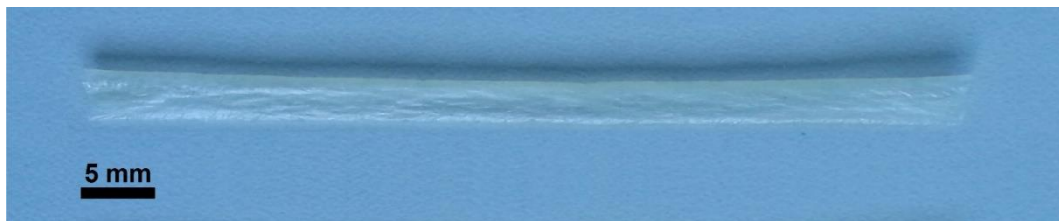


Abbildung 3-3: Collagen-Röhre mit 3,5 mm \varnothing , auf die verwendete Länge von 6 cm zugeschnitten

Vor der Besiedlung musste das Collagen rehydriert werden. Hierfür wurde es für 24 bis 48 h im später verwendeten Zellkulturmedium (vgl. 3.2.2) inkubiert. Im Verlauf der Rehydrierung wurde das Material schwach durchsichtig und flexibel.

Die CCC zur Verwendung in Multiwellplatten wurden zunächst in eine 24-Well-Platte überführt und mit PBS (Phosphatgepufferte Salzlösung, engl.: *Phosphat buffered saline*) rehydriert. In einem weiteren Schritt wurde das PBS wieder entfernt und die CCC über Nacht getrocknet, um sie zuverlässig auf dem Plattenboden zu fixieren. Anschließend konnten die CCC mit Zellkulturmedium erneut rehydriert und mit Zellen besiedelt werden.

3.1.3 Humane dezellularisierte Venen

Die humanen dezellulierten Venen wurden von PD Dr. med Gerd Juchem von der Herzchirurgischen Klinik zur Verfügung gestellt. Ebenso wie die Venen, die zur Zellisolation (s. Kapitel 3.2.1) verwendet wurden, handelt es sich bei den dezellulierten Venen um Reststücke der *Vena saphena magna* nach Bypassoperation. Die Dezellularisierung erfolgte nach einem streng vertraulichen Verfahren, welches laut Aussage von Dr. Juchem ohne zellschädigende Substanzen durchgeführt wurde und eine Lagerung der Venen bei 4 °C über einen längeren Zeitraum erlaubte. Der Innendurchmesser der Venen war variabel aber stets geringer als 6 mm und die Länge betrug mindestens 60 mm. Seitenäste an den Gefäßen wurden mit Klammern verschlossen.

3.1.4 Bakterielle Cellulose

Die vom Bakterium *Gluconacetobacter xylinus* produzierte BC wurde von der Firma Xellutec GmbH (ehem. Bioregeneration GmbH) unter dem Namen Xellulin® in Form von Patches für 24-Well-Zellkulturplatten, sowie als Röhren mit einer Länge von bis zu 6 cm und einem Durchmesser von 3,5 mm (Abbildung 3-4) zur Verfügung gestellt [80], [81]. Das Material ermöglicht es laut Herstellerangaben, im Gegensatz zur Kultivierung auf Kunststoff, Zellen über einen längeren Zeitraum auch nach Erreichen der Konfluenz vital zu erhalten und Splitten der Zellen überflüssig zu machen



Abbildung 3-4: Röhre aus BC

Vor der Verwendung wurde das Material für mindestens 24 h im später verwendeten Zellkulturmedium vorinkubiert und das Medium unmittelbar vor dem Einsatz des Scaffolds nochmals erneuert.

3.2 Zellen

3.2.1 Zellisolation

Zur Isolation humaner FB und EC wurden Überreste der Beinvene *Vena saphena magna* (Abbildung 3-5) von Bypass-Patienten der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München verwendet.

Ein positives Votum der Ethikkommission für die Verwendung der Venen in anonymisierter Form nach entsprechender Aufklärung und unterschriebener Einverständniserklärung der Patienten lag vor. Im Jahr 2013 wurden in der Klinik 733 Eingriffe an den Koronargefäßen vorgenommen, wobei 80 % der Patienten männlich waren und das durchschnittliche Alter 71 Jahre betrug.



Abbildung 3-5: Ein Stück Beinvene zur Gewinnung von primären Endothelzellen und Fibroblasten

Die Venenstücke mit einer Länge von 5 bis 12 cm Länge wurden bei 4 °C in M199-Lösung (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) mit 0,2 % Penicillin-Streptomycin (5000 U und 5 mg/ ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) gelagert. Die Aufarbeitung unter sterilen Bedingungen (Laminar Airflow „Hera Safe“, Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland) erfolgte innerhalb von maximal 5 Tagen.

Hierzu wurden die Venen kanüliert und mit 30 ml Spülmedium (M199 mit 300 IE Heparin B. von Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland und 3 mg Gentamycin von Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) pulsierend durchspült, um Blutreste zu entfernen. Ein 0,5 cm langes Stück der Vene wurde abgeschnitten und zur späteren Isolation der FB wieder in das Medium (M199 mit 0,2 % Penicillin-Streptomycin zurückgegeben). Anschließend wurde die Vene zur Isolation der EC mit einer steril filtrierten Collagenase-Lösung (14 mg Collagenase II, 280 U von Worthington Biochemical Corporation, New Jersey, USA in 10 ml PBS von Biochrom AG, Berlin, Deutschland; mit 1 % HSA von ZLB Behring, Bern, Schweiz) durchspült, die andere Seite mit einer Klemme verschlossen und die Vene mit leichtem Druck befüllt. Die Vene wurde in einem verschlossenen, mit warmen PBS befülltem Gefäß für 15 min im Brutschrank inkubiert.

Anschließend wurde die Collagenase-Lösung durch Zugabe von 30 ml Stopplösung (M199 mit 20 % fötalem Kälberserum (FCS, engl.: *fetal calf serum*), Lonza GmbH, Köln, Deutschland) inaktiviert und die angedauten EC aus der Vene in ein Zentrifugenröhrchen (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland) gespült. Die Zellsuspension wurde bei 500 U/min (Zentrifuge „Rotina 46 R“ Hettich, Tuttlingen, Deutschland) für 7 min zentrifugiert und der Überstand vorsichtig abgenommen. Die gewonnenen Zellen wurden in 4,5 ml Endothelzellmedium (ECGM, Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 6 % FCS und 0,2 % Penicillin-Streptomycin resuspendiert und in einer Zellkulturflasche (T12,5 cm², Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) bei 37 °C / 5 % CO₂ kultiviert.

Um die Zellausbeute zu erhöhen wurde der Vorgang ein zweites Mal wiederholt und eine weitere Zellkulturflasche angelegt.

Die FB-Gewinnung erfolgte mittels der Deckglasmethode (Abbildung 3-6). Hierfür wurden in einer Zellkulturschale (Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Deutschland) kleine Mengen von zuvor dampfsterilisiertem Silikongel (Dow Corning Corporation, Midland, USA) im Abstand eines Deckglases platziert. Das zuvor abgeschnittene Venenstück wurde mit einem Skalpell in 1 mm² große Quadrate zerteilt und 5 bis 7 Stücke zwischen den Silikontropfen abgelegt. Anschließend wurde das Deckglas über den Venenstücken positioniert und fest angedrückt. Fibroblastenmedium (FGM, Promocell GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit 11 % FCS und 0,2 % Penicillin-Streptomycin wurde unter das Deckglas laufen gelassen und die Schale aufgefüllt. Nach dem Auswachsen der Zellen aus den Gewebestücken innerhalb von

ca. 2 Wochen wurden das Deckglas und die Gewebestücke entfernt und die Zellen gemäß Kapitel 3.2.2 in eine T175 Zellkulturflasche passagiert.

Sowohl EC als auch FB wurden nach dem Protokoll unter Kapitel 3.4.1.1 auf einem Zellkulturobjektträger (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgesät, bei Konfluenz fixiert und immunzytochemisch gefärbt. Hierdurch wurde Reinheit und Qualität der Zellen bestimmt.

Ein vollständiger Mediumwechsel erfolgte bei FB und EC alle 2 bis 3 Tage mit entsprechendem zellspezifischem Medium.

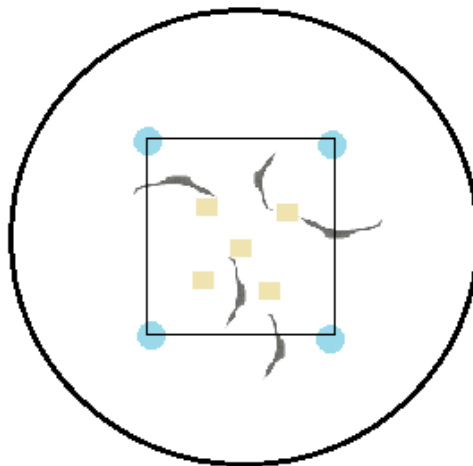


Abbildung 3-6: Darstellung der Deckglasmethode zur Isolation von FB (grau). Die Venenstücke (gelb) werden in einer Zellkulturschale unter einem Deckglas, fixiert durch Silikontropfen (blau), positioniert. Die FB erreichen innerhalb von ca. 2 Wochen Konfluenz.

3.2.2 Zellkultivierung

Nach erfolgreicher Expansion der Zellen auf eine Zelldichte von 90 % wurden diese trypsinisiert und in T175 Kulturflaschen passagiert. Hierzu wurde zunächst das Zellkulturmedium abgenommen und die Zellen mit PBS gewaschen. Erneut wurde die Flüssigkeit verworfen und auf 37 °C vorgewärmte Trypsin-EDTA-Lösung (10x Lösung, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland; 1:20 mit PBS verdünnt) auf die Zellen gegeben, so dass sie vollständig mit der Lösung bedeckt waren. Die Menge hing jeweils von der Größe der Zellkulturflasche ab. Die Trypsinierung konnte durch Inkubation im Brutschrank beschleunigt werden. Nach 2 bis 3 Minuten wurde die Zellkulturflasche kräftig gegen die Handfläche geklopft und im Mikroskop das Ablösen der Zellen kontrolliert. Die Enzymreaktion wurde durch Zugabe der doppelten Menge an M199 mit 20 % FCS gestoppt und die Zellsuspension zur Vereinzelung der Zellen mehrfach auf und ab pipettiert. Die Suspension wurde vollständig in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen mit Schraubdeckel (Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland) überführt und für 7 min bei 500 g zentrifugiert (Zentrifuge „Rotina 46 R“, Hettich, Tuttlingen, Deutschland). Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet im spezifischen Medium resuspendiert und in T175 ausgesät.

Nach erneutem Erreichen von 90 % Zelldichte wurden die Zellen im Verhältnis 1:3 gesplittet und je 9 vials bei Passage 3 kryokonserviert. Hierzu wurden die Zellen wie beschrieben trypsinisiert und zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 3 ml eiskaltem Einfriermedium, bestehend aus 70 % zellspezifischem Medium, 20 % FCS und 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), resuspendiert. Je 1 ml der Suspension wurden zügig auf vorbeschriftete Kryoröhrchen (Cryo Tubes, Nunc GmbH & Co. KG, Langenselbold, Deutschland) verteilt, die Röhrchen verschlossen und umgehend für mindestens einen Tag bei -80°C im Nalgene® Cryo 1°C Freezing Container (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) langsam abgekühlt und anschließend in den Stickstofftank überführt.

Die so eingefrorenen Zellen konnten über lange Zeiträume, mit gleichbleibender Vitalität, gelagert werden. Zudem standen so von jeder isolierten Vene ausreichend Zellen zum benötigten Zeitpunkt zur Verfügung, um die Besiedlung der unterschiedlichen Scaffolds im BR mit Zellen des gleichen Spenders zu gewährleisten.

Zum Auftauen der Zellen wurden die Kryoröhrchen aus dem Stickstofftank entnommen und zügig mit 37 °C warmen Zellkulturmedium versetzt. Mit einer 1000 µl Pipette (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) wurde das Medium so oft auf und ab pipettiert, bis die Zellsuspension komplett aufgetaut war. Die Suspension wurde wie gewohnt zentrifugiert und die Zellen wiederum in T175 Zellkulturflaschen ausgesät.

FB erreichten in der Regel innerhalb von 5 bis 7 Tagen 90 % Zelldichte während EC bereits nach 2 bis 3 Tagen erneut gesplittet werden mussten.

3.2.3 Zellzählung

Zur Besiedlung der Scaffolds wurde stets eine definierte Zellzahl eingesetzt (s. Kapitel 3.3.5). Um diese zu bestimmen, wurde sich der Zählkammer Neubauer improved C-Chip (Biochrom AG, Berlin, Deutschland) bedient. 10 µl gut gemischter Zellsuspension wurden mit 20 µl Tryphanblau (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) versetzt. Tryphanblau dringt in tote Zellen ein, nicht jedoch in lebende und ermöglicht so eine Unterscheidung. 10 µl der Suspension wurden in die Zählkammer überführt und in vier Großquadraten (s. Abbildung 3-7) die ungefärbten, lebenden Zellen ausgezählt.

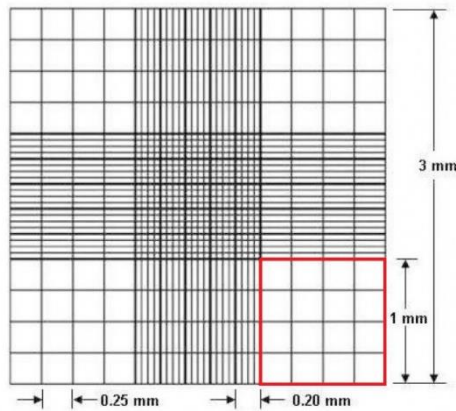


Abbildung 3-7: Zählquadrate der Neubauer-Kammer; ein auszuzählendes Großquadrat ist rot umrandet.

Die Gesamtzellzahl pro ml errechnet sich nach dem Mittelwert der pro Großquadrat gezählten Zellen, dem Kammerfaktor (für die verwendete Neubauerkammer = 10^4) und dem Verdünnungsfaktor (bei einer 1:3 Verdünnung = 3), womit sich folgende Formel ergibt:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl gezählter Großquadrate}} \times \text{Kammerfaktor} \times \text{Verdünnungsfaktor} \quad (1)$$

3.3 Bioreaktor

3.3.1 Aufbau des Bioreaktors

Das ursprüngliche Setup des Bioreaktors (Abbildung 3-8) geht auf die in unser Arbeitsgruppe angefertigte Diplomarbeit „A New Seeding and Conditioning Bioreactor for Vascular Tissue Engineering“ von Anja Friedrich zurück [77].

Ziel jener Arbeit war es, ein System zu entwickeln, in dem alle Prozessschritte der Herstellung eines TEVG durchgeführt werden konnten, ohne die Gefäßprothese zwischendurch von einem in ein anderes System transferieren zu müssen. Dynamische Besiedlung, Konditionierung der Zellen sowie eine High-Flow-Perfusion sollten nacheinander oder parallel ebenso möglich sein wie eine zeitgleiche Prozessierung von mehreren Grafts.

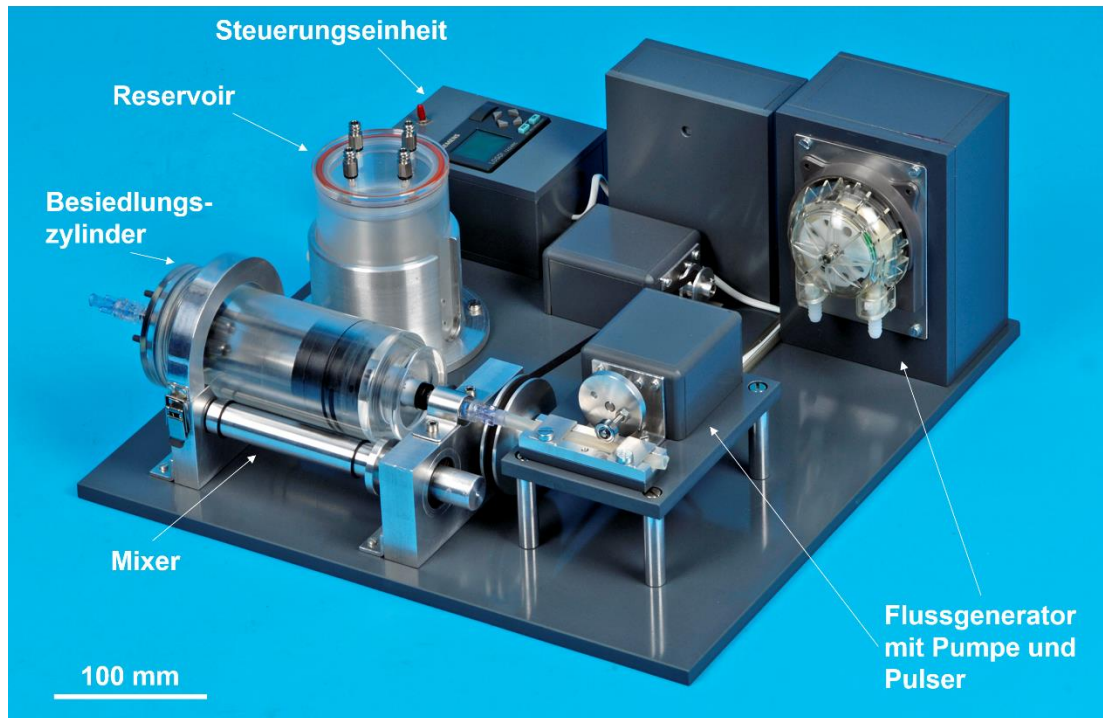


Abbildung 3-8: Bioreaktor zur Besiedlung und Konditionierung von Gefäßprothesen. Entnommen aus [77]

3.3.2 Umbau zur Optimierung des Bioreaktors

Die Optimierung des BR wurde fortwährend umgesetzt. Im Zuge der ersten Experimente wurde deutlich, dass der Prototyp diverse Defizite aufwies, die nach und nach behoben werden konnten. Die notwendigen Änderungen am Bioreaktor sind im Ergebnisteil der Arbeit aufgeführt und gewährleisteten schließlich einen zuverlässigen Betrieb.

3.3.3 Sterilisation des Bioreaktors

Vor der Verwendung des BR zur Besiedlung von Scaffolds mit Zellen, mussten alle Komponenten, die mit Zellen oder mit Medium in Kontakt kommen sollten, sterilisiert werden (s. Abbildung 3-9).

Zur Sterilisation wurden die Komponenten doppelt in Folie eingeschweißt und anschließend Formaldehydgas bei 60 bis 70 °C für 7 h ausgesetzt.

Die Verifizierung der Sterilisation wurde bereits im Rahmen der Diplomarbeit von Anja Friedrich durchgeführt. Darüber hinaus war es, dank des verwendeten Materials Polymethylmethacrylate (PMMA) von Reservoir und Besiedlungs-zylinder, stets möglich, das Medium während eines Experiments im BR optisch zu überprüfen.



Abbildung 3-9: Übersicht von sterilisierten Komponenten des BR; a: Besiedlungszylinder und Reservoir, b: Schläuche sowie diverse Adapter.

3.3.4 Druckmessung im Bioreaktor

Um den Fluss durch das Scaffold zu validieren, wurde mit freundlicher Unterstützung von Fabian König der Druck an verschiedenen Positionen im Bioreaktor gemessen. Für alle Messungen wurde der Druck-Transmitter CPT2500 (WIKA GmbH, Klingenberg, Germany) verwendet und die Daten mit der zugehörigen Software ausgewertet (USBsoft2500). Ein 3-Wege-Hahn (Discofix C, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde als Adapter verwendet, um den Sensor ohne Störung des laufenden Bioreaktors anschließen zu können. Der Sensor mit einem Messbereich von 0 bis 300 mmHg hatte eine Abweichung von ± 3 mmHg. Es wurde eine Aufnahmefrequenz von 100 Hz eingestellt und über einen Zeitraum von 30 s gemessen, um Messfehler und zeitlich begrenzte Effekte zu unterbinden. Messungen wurden ohne Pulsation bei 10, 20, 40 und 100 dyn/ cm² und unter pulsatilen Bedingungen bei 20, 40 und 100 dyn/ cm² vorgenommen. Die Messdaten wurden mit der USBsoft2500 Software aufgezeichnet. Die abschließende Auswertung erfolgte mit Microsoft Excel 2010 und Visual Basic for Applications (VBA, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA).

3.3.5 Besiedlung verschiedener Scaffoldmaterialien

Die Besiedlung der Scaffoldmaterialien erfolgte zunächst mit FB der Passage 5 (p5) und anschließend mit EC p5. Entsprechend musste das Auftauen der Zellen geplant werden. Die BC wurde vor der Verwendung im BR auf Besiedelbarkeit getestet. Hierzu wurden zum einen für das 24-Well-Format passende Patches besiedelt und darüber hinaus wurde eine Röhre der Länge nach aufgeschnitten und anschließend in entsprechend große Scheiben geschnitten. Mit einem Teflonröhrchen (Laborwerkstatt Großhadern, München, Deutschland) wurde die BC in einer 24-Well-Platte fixiert (vgl. Abbildung 3-10).

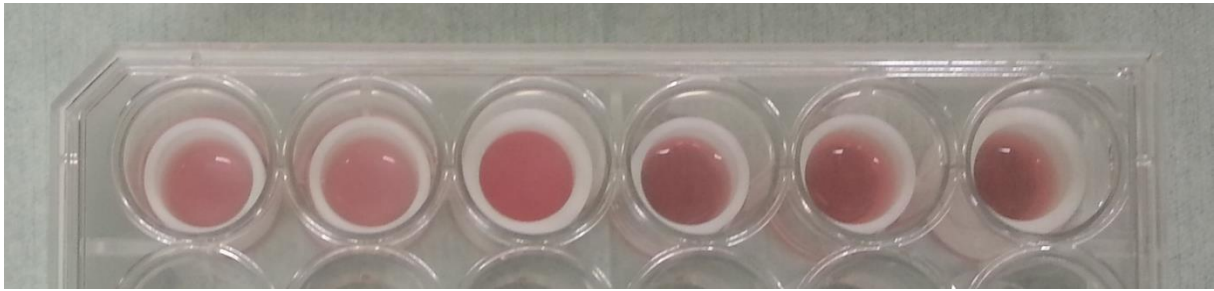


Abbildung 3-10: Besiedlung von BC in 2D. Die ersten 3 Wells sind mit Material von Röhren bestückt, die letzten 3 mit deutlich dünneren Patches. Zur Fixierung der Patches in einer 24-Well-Platte wurden Teflonröhrchen verwendet.

Zur Bestimmung der erforderlichen Zellzahl wurde sich an bereits bestehenden Protokollen beim Umgang mit PU orientiert [47] und schließlich eine Zahl von 750 000 Zellen/ cm² festgelegt.

3.3.6 Besiedlung im Bioreaktor

Die Röhren aus dem jeweiligen Material wurden über Luer-Lock Adapter (Nylon-Anschlüsse für 6 mm \varnothing , Vieweg GmbH, Kranzberg, Deutschland) am Gestell des Besiedlungszylinders befestigt und mit chirurgischem Faden aus Polypropylene (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Deutschland) fest geknotet (vgl. Abbildung 3-11).

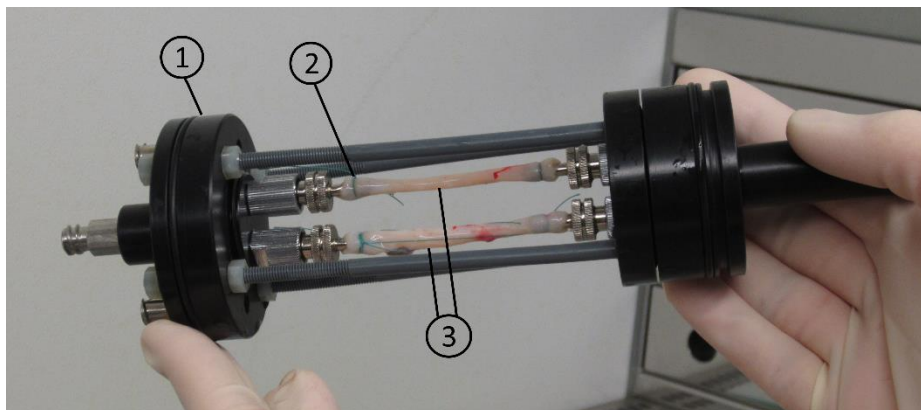


Abbildung 3-11: Ansicht des Scaffoldhalters (1), an welchem mit chirurgischem Faden (2) zwei Venen (3) eingespannt sind. In der Abbildung sind noch die zunächst getesteten Luer-Lock-Adapter aus Metall (VBM Medizintechnik GmbH, Sulz, Deutschland) zu sehen. Diese wiesen nach mehrmaliger Verwendung Ablagerungen auf, so dass auf Nylonadaper umgestiegen wurde.

Der Scaffoldhalter wurde in das Gehäuse geschoben und der Besiedlungszylinder mit FGM gefüllt. Anschließend wurden FB (750 000 Zellen/ cm²) in 2 ml Medium resuspendiert und über den in Flussrichtung vor dem Zylinder liegenden Anschluss in das Lumen des Scaffolds appliziert (vgl. Abbildung 3-12).

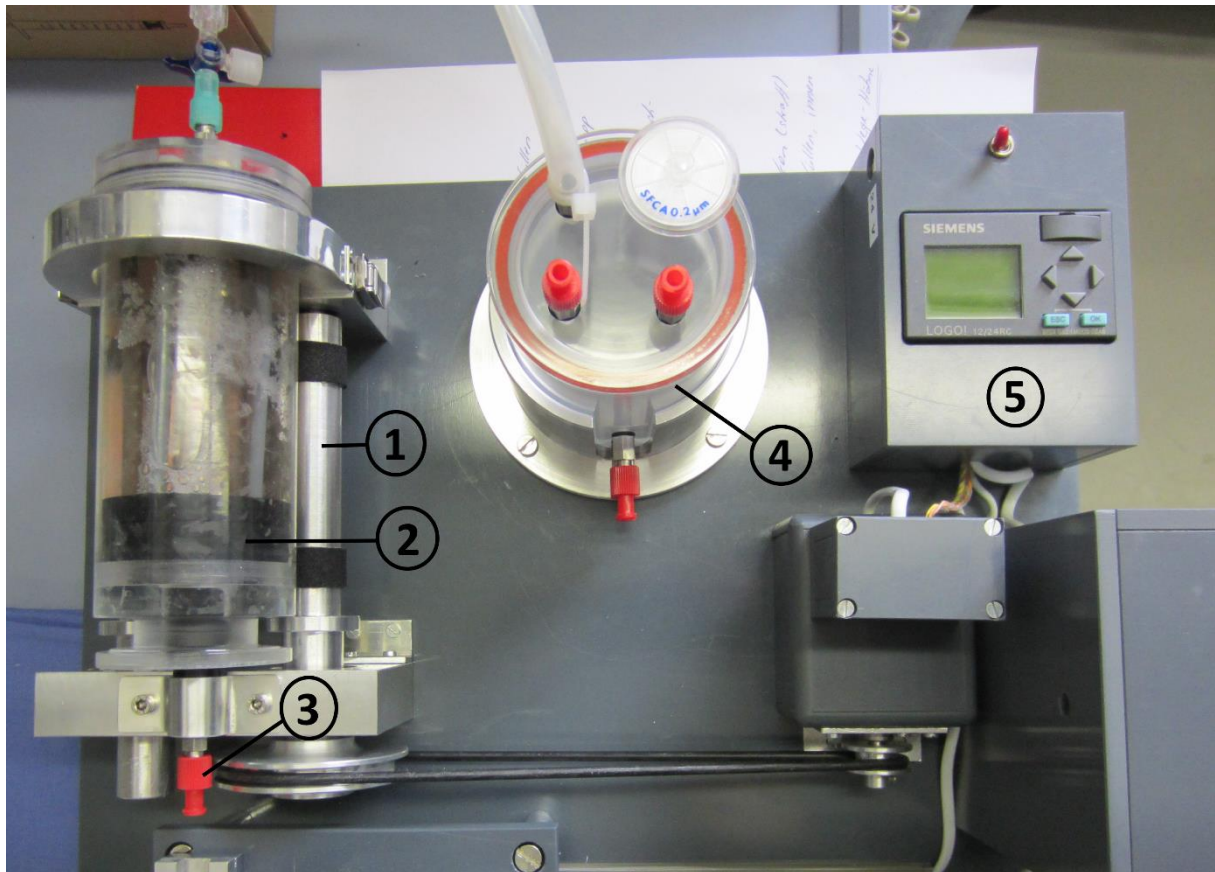


Abbildung 3-12: Darstellung des funktionsbereiten BR mit Mixer (1), Besiedlungszylinder (2), Einspritzstelle für die Zellen (3), Reservoir (4) sowie der Steuerungseinheit (5) zur Rotation der Scaffolds.

Um eine Besiedlung auf der gesamten Scaffoldwand zu erreichen wurde der Besiedlungszylinder auf dem Mixer für 7 h nach einem festgelegten Programm rotiert. Der Zylinder wurde hierbei für jeweils 20 sec in Uhrzeigerrichtung, und nach einer 20-minütigen Pause, für 30 sec gegen den Uhrzeigersinn rotiert. Die verschiedenen Zeiten stellten sicher, dass der Zylinder nach jeder Rotation an einer anderen Stelle zum Stillstand kam und so die Röhre vollständig besiedelt werden konnten.

3 Tage nach der Besiedlung mit FB wurde das FGM durch ECGM ersetzt. Anschließend wurde der Besiedlungsprozess mit EC auf die gleiche Weise wie mit den FB wiederholt. Nach insgesamt 6 Tagen wurde der Versuch beendet und Proben für IHC und für REM (vgl. 3.4.1 und 3.4.2) genommen. Bei den Versuchen handelte es sich um 3-fach-Ansätze mit jeweils zwei besiedelten Scaffolds eines Materials pro Lauf, so dass insgesamt 6 Röhren pro Material besiedelt wurden.

3.3.7 Besiedlung und Konditionierung im Bioreaktor

Zunächst wurde ein Vorversuch zur Besiedlung unter Perfusion mit Polyurethan ($n = 3$) durchgeführt. Aufgrund der geringen Rauheit des Gefäßes und der geringen Reynolds-Zahl konnte laminarer Fluss angenommen werden:

Die Reynolds-Zahl (Re) basiert auf der gemittelten Geschwindigkeit des Fluids (v_m), dem Innendurchmesser der Röhre (d) und der Viskosität des Fluids (ν).

$$Re = \frac{v_m \times d}{\nu} \quad (2)$$

Die gemittelte Geschwindigkeit vom Zellkulturmedium v_m ist definiert als die volumetrische Flussrate (\dot{v}) geteilt durch die Querschnittsfläche der Röhre (A).

$$v_m = \frac{\dot{v}}{A} \quad (3)$$

Der Innendurchmesser der PU-Röhre lag bei 6 mm. Für die Viskosität des Mediums wurde ein Wert von 1 mm²/s gemessen. Somit lag Re zwischen 5 und 50. Turbulenzen im System treten aber erst ab einer $Re > 2200$ auf.

24 Stunden nach der FB-Besiedlung gemäß dem oben beschriebenen Protokoll zur Rotation des Besiedlungszyinders (s. Kapitel 3.3.6) wurde jede Röhre mit dem voreingestellten Volumenstrom von 18 ml/ min für 2 Tage perfundiert. Nach der Besiedlung mit EC (750 000 Zellen/ cm²) wurden die Röhren erneut auf die gleiche Weise perfundiert. Nach insgesamt 6 Tagen wurden die besiedelten Röhren pulsatilem Fluss mit 60 bpm (engl.: *beats per minute*) ausgesetzt indem der Quetscher für 24 Stunden zugeschaltet wurde.

Da die Besiedlung der Scaffolds unzureichend war wurde die Perfusion im Weiteren auf den minimal möglichen Volumenstrom von 12,5 ml/ min (Scherstress = 100 dyn/ cm²) gesenkt. Ansonsten wurde das Protokoll beibehalten.

Nach diesen vorläufigen Perfusionsexperimenten wurde eine Infusionspumpe (Infusomat fm, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) für die weiteren Versuche verwendet, um den Fluss zu verringern. Darüber hinaus wurde der Besiedlungs- und Perfusionsprozess optimiert und verkürzt.

Beim ersten Versuch, wurden 24 h nach Einsaat der FB, welche Rotation aber keiner Perfusion ausgesetzt waren, die EC eingesät. 48 h nach Einsaat der EC startete die Perfusion mit 30 dyn/ cm² und nach insgesamt 7 Tagen wurde der Versuch beendet und Proben für die Auswertung mittels REM entnommen. Mangelhafte Besiedlungserfolge führten zu einer empirischen Testung und Anpassung des Protokolls.

Die Besiedlungsdauer mit Rotation wurde auf 6 Stunden reduziert und die Perfusionsdauer auf jeweils 42 für die FB bzw. 43 Stunden für die EC gesenkt. Die Zellen wurden einem geringeren Scherstress ausgesetzt, der darüber hinaus schrittweise wie in Abbildung 3-13 dargestellt, von 10 auf 40 dyn/ cm² (Flussmenge = 1,27 bis 5,1 ml/ min, für PU) gesteigert wurde. Der Quetscher wurde jeweils 24 Stunden nach der Besiedlung mit FB bzw. EC zugeschaltet. Nach Abschluss der Besiedlung und Konditionierung wurden die besiedelten Röhren entnommen, in Stücke zerteilt und Proben für REM, IHC und PCR nach Protokoll (s. Kapitel 3.4) aufgearbeitet. Auch hier wurden jeweils 6 Röhren pro Material besiedelt.

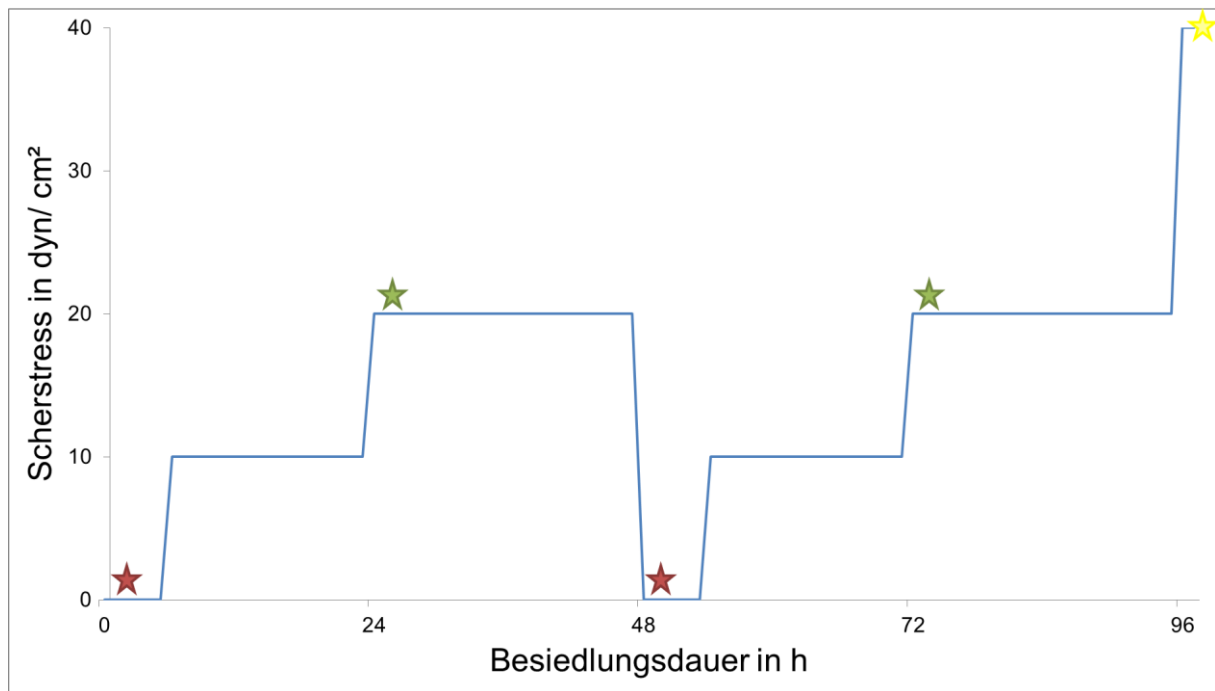


Abbildung 3-13: Finales Flussprofil zur Konditionierung von TEVG. Nach der Besiedlung (rote Sterne) mit FB ($t = 0$ h) wurde der Schersstress stufenweise zunächst auf 10 dyn/ cm^2 ($t = 6$ h) und dann auf 20 dyn/ cm^2 ($t = 24$ h) erhöht. EC wurden bei $t = 48$ h ausgesät und ebenso wie die FB perfundiert. Die Pulsation startet (grüne Sterne) bei $t = 24$ h, wird zur Aussaat der EC gestoppt und startet erneut bei $t = 72$ h. Nach 96 h wird der Schersstress schließlich auf 40 dyn/ cm^2 erhöht und 1 h später die TEVG geerntet (gelber Stern)

3.4 Auswertungsmethoden

3.4.1 Immunfärbung

Mit Hilfe der Immunfärbung können Gewebe-(Immunhistochemie) oder Zellkulturpräparate (Immunzytochemie, IC, engl.: Immunocytochemistry) hinsichtlich des Auftretens und der Lokalisation ausgesuchter Proteine untersucht werden.

Hierfür bedient man sich definierter Antikörper, die an das Epitop des gesuchten Antigens binden und anschließend durch eine zuvor abgelaufene Farbreaktion und Auswertung am Lichtmikroskop sichtbar gemacht werden können.

Es ist zwischen der direkten Methode und verschiedenen indirekten Nachweistechiken zu unterscheiden. Letztere können zu einer deutlichen Signalverstärkung beitragen.

3.4.1.1 Immunzytochemie

Zur Charakterisierung der isolierten Zellen wurden etwa 100 000 Zellen in 0,5 ml Medium resuspendiert und auf einem BD Falcon™ CultureSlide (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) ausgesät. Hierbei handelt es sich um Glasobjektträger mit Kammer-Aufsätzen aus Kunststoff, die eine Kultivierung in kleinen, genau abgegrenzten Bereichen auf der Glasoberfläche ermöglichen. Bei Konfluenz der Zellen wurde das Medium dekantiert, die Zellen 2x mit auf 37°C vorgewärmtem PBS gewaschen und anschließend für 2 min mit eiskaltem Methanol / Aceton (1:1) (Pharmazie Klinikum Großhadern, München, Deutschland

und Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) fixiert. Die Lösung wurde entfernt und die Objektträger getrocknet. In Alufolie gewickelt konnten diese bei -20°C gelagert werden.

Nach dem Erwärmen auf Raumtemperatur (RT) wurden die Objektträger mit *Aqua dest.* (Fresenius Kabi AG, Bad Homburg, Deutschland) und anschließend mit PBS in einer Färbeschale mit Färbegestell aus Glas (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) gespült. Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase durch Inkubation in H₂O₂ (1 ml 30%-ige Lösung auf 200 ml PBS, Vector Laboratories INC, California, USA) für 10 min in einer feuchten Kammer (Laborwerkstatt Großhadern, München, Deutschland). Nach einem Waschschrift in PBS-Brij (1 l PBS mit 1 ml Brij 35-Lösung; Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) erfolgte die Inkubation des primären Antikörpers, verdünnt mit Antibody Diluent (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) auf die entsprechende Konzentration (s. Tabelle 3-1) für 30 min bei RT. Hierbei wurden die Fibroblasten auf TE7, alpha-Actin, SMC-Myosin, Collagen IV, Fibronectin und CD31 untersucht während bei den Endothelzellen Antikörper für CD31, VE-Cadherin sowie TE7 verwendet wurden.

Nach der Inkubation und anschließendem Spülen mit PBS-Brij wurden die Kammergitter der Objektträger entfernt und die gebundenen Antikörper mit dem „HRP Detection System“ (Medac GmbH, Hamburg, Deutschland) sichtbar gemacht. Hierfür wurden die Präparate zunächst für 10 min mit dem sogenannten Verstärker inkubiert, welcher an die primären Antikörper bindet. Nach einem erneuten Waschschrift wurde der Verstärker wiederum vom HRP Polymer gebunden. Die abschließende Farbreaktion mit dem AEC-Peroxidase Substrat (2 Tropfen Pufferlösung + 3 Tropfen Farbsubstrat + 2 Tropfen H₂O₂ in 5 ml *Aqua dest.*), welches maximal 20 Minuten vor Benutzung angesetzt wurde, machte die detektierten Zielproteine als rote Färbung sichtbar. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) für 4 min und anschließendem Bläuen in Leitungswasser für mindestens 5 Minuten.

Die Präparate wurden mit wässrigem Eindeckmedium (Ultramount Aqueous Permanent Mounting Medium; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) und einem Deckglas (Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland) eingedeckt und konnten nach der Trocknung am Mikroskop (Leica DMR microscope + Digital Cam DC 200 mit IM50 Software; Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, Deutschland) ausgewertet werden.

Für die Verwendung im Experiment war es ausschlaggebend, dass die jeweilige Zellkultur eine Reinheit von mindestens 95 % aufwies.

3.4.1.2 Einbetten in Paraffin und Entparaffinierung der Gewebeproben und Scaffolds

Für die Färbung von Gewebepreparaten und besiedelten Scaffolds mussten diese zunächst in Paraffin eingebettet werden. Hierzu wurden die Proben unmittelbar nach der Ernte für mindestens 24 h in Formalin (Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland, 4%-ig in PBS) eingelegt. Anschließend wurden die Präparate mit freundlicher Unterstützung des

Zentrums für Neuropathologie und Prionenforschung der LMU nach folgendem Protokoll entwässert: 2 x 1 h in 70 % Ethanol, 3 x 1 h in 96 % Ethanol, 3 x 1 h in 100 % Ethanol, 2 x 1 h in 100 % Xylol (Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), jeweils bei RT gefolgt von einem Paraffinbad für 2 x 2 h bei 60 °C. Bei den 25 Schichten dicken Polyurethanröhren wurde die Inkubation in Xylol auf 1 x 10 min reduziert, da sich das Material gegenüber Xylol für eine längere Inkubationsdauer nicht als ausreichend stabil erwies. Am folgenden Tag konnten die Proben in Paraffinblöckchen eingegossen und bei -20 °C gelagert werden. Von den Präparaten wurden am Schlittenmikrotom (Microm HM400R, Microm International, Walldorf, Deutschland) mit Schnellgefriereinrichtung (KS34, Thermo Scientific, Walldorf, Deutschland) 5 µm dicke Schnitte angefertigt, diese ins Streckbad (Paraffin Tissue Floating Bath, Medax GmbH & Co. KG, Rendsburg, Deutschland) überführt und anschließend auf Objektträger (Schubert & Weiss-OMNILAB GmbH & Co.KG, München, Deutschland) aufgebracht (vgl. Abbildung 3-14).

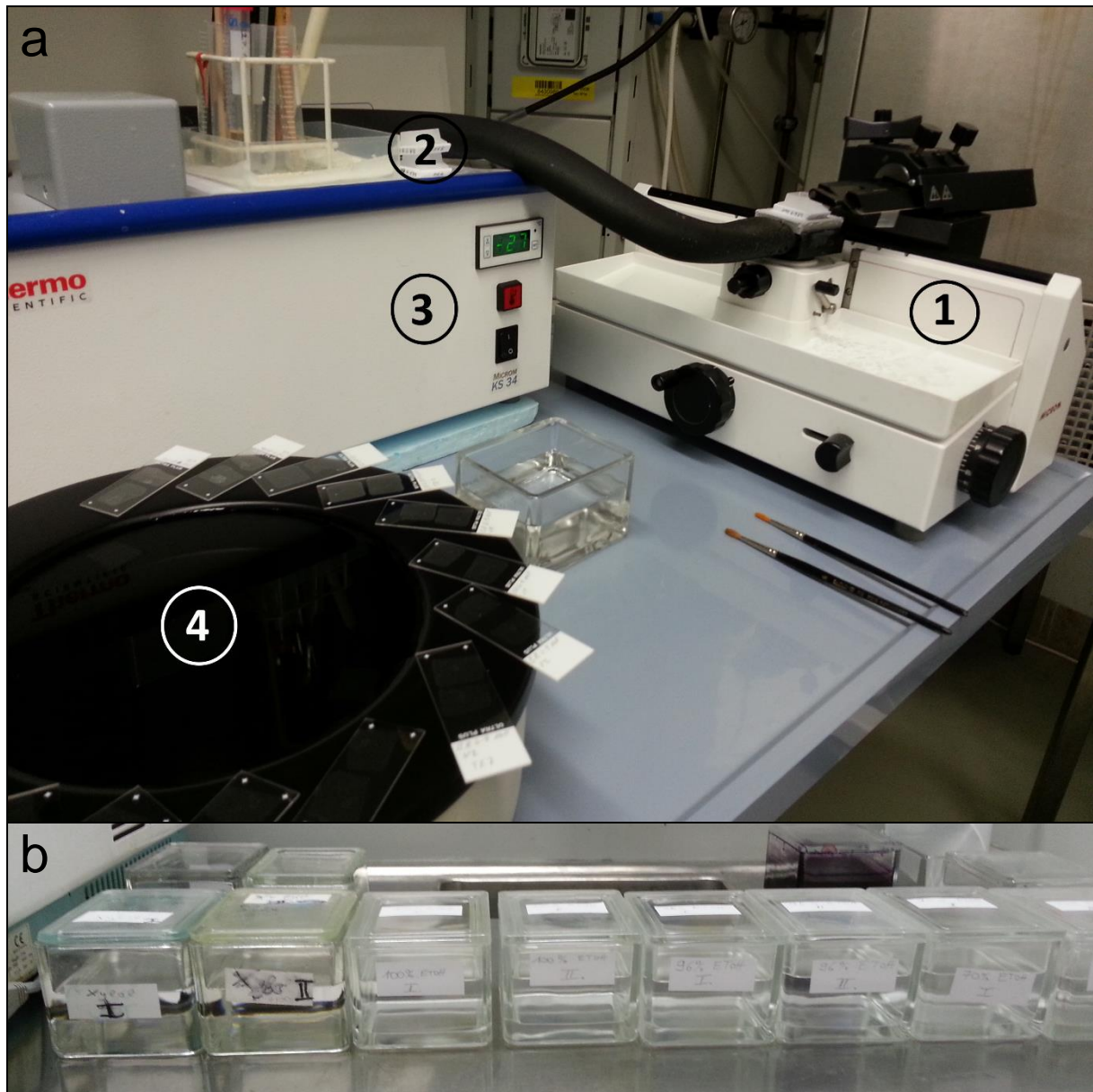


Abbildung 3-14: Arbeitsplatz zur Anfertigung von Paraffinschnitten (a) mit Kryotom (1), Paraffinblöckchen (2), Kühleinheit (3) und beheizbarem Wasserbad (4), sowie eine absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung der Präparate (b).

Zur Fixierung der Schnitte wurden diese zunächst über Nacht bei 36 °C im Wärmeschränk (Inkubator APT Line, Binder GmbH, Tuttlingen, Deutschland) getrocknet. Bis zum Tag der Färbung konnten die Objektträger im Kühlschränk gelagert werden. Dann wurden die Objektträger mit den Paraffinschnitten zunächst für 30 min bei 50 °C in den Wärmeschränk gestellt. Die Entparaffinierung erfolgte als absteigende Alkoholreihe in dafür vorgesehenen Glasküvetten: 2 x 15 min Roti-Histol (Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), 2 x 5 min 100 % Ethanol, 2 x 5 min 96 % Ethanol, 2 x 70 % Ethanol (jeweils Apotheke Klinikum Grosshadern, München, Deutschland), 2 x 3 min *Aqua dest.* und 2 x 3 min PBS.

3.4.1.3 Immunhistochemie an Paraffinschnitten

Durch das Einbetten in Paraffin kann es in den Präparaten zu Veränderungen des Epitops kommen, so dass dieses vom Antikörper nicht mehr erkannt wird. Deshalb erfolgte je nach verwendetem Antikörper eine Antigendemaskierung zur Wiederherstellung des Epitops. Zunächst wurde im Anschluss an die Entparaffinierung die Zellmembran durch eine 10-minütige Inkubation in PBS mit 0,5 % Triton-X (Carl-Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) permeabilisiert. Zur Demaskierung wurde je nach Antikörper (s. Tabelle 3-1) eines der folgenden Verfahren verwendet:

Bei der Proteolyse wurden die Schnitte für 3 min bei RT in einer Lösung mit Proteinase (Endkonzentration 2,8 mU/ ml, Sigma Aldrich Chemie, GmbH, Taufkirchen, Deutschland) in *Aqua dest.* inkubiert. Die Antigendemaskierung in einer Tris/ EDTA-Lösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) mit einem pH-Wert von 9,0 erfolgte für 10 Minuten in der Mikrowelle. Zunächst wurde die Lösung aufgekocht und dann zusammen mit den Schnitten weiter erwärmt. Vor dem nächsten Spülschritt musste die Lösung wieder auf ca. 40 °C abkühlen. Die *Target Retrieval Solution* (TRS, Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) mit einem pH-Wert von 6,0 wurde ebenfalls erhitzt und die Schnitte anschließend für 15 Minuten in der Mikrowelle inkubiert. Schließlich wurde ein 0,1 mM EDTA-Puffer (EDTA, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) mit einem pH-Wert von 8,0 in der gleichen Weise verwendet und die Schnitte für 10 Minuten in der Mikrowelle erhitzt.

Das weitere Vorgehen entspricht dem Protokoll der IC, wobei die Inkubation des primären Antikörpers über Nacht (ü.N.) im Kühlschrank erfolgte. Hierdurch ergaben sich zum Teil andere Verdünnungen.

Tabelle 3-1: Übersicht der Verdünnung und Hersteller der verwendeten Antikörper für IC, IHC für die Paraffinschnitte inklusive der dazugehörigen Demaskierungsverfahren und für die IHC an Kryoschnitten

	Antikörper (Klon/ Bestellnummer)	Verdünnung (IC, 1 h)	Verdünnung (IHC, ü.N.)	Hersteller	Demaskierung, nur für IHC
Zellkultur (IC) und Paraffinschnitte (IHC)	anti-Collagen IV (COL-94)	1:600	1:600	Sigma	Proteolyse
	anti-Fibronectin (F3648)	1:3000	1:3000	Sigma	
	anti-ASMA (1A4)	1:100	1:80	Dako	Tris/ EDTA pH 9
	anti-CD 31 (JC70A)	1:20	1:30	Dianova	TRS pH 6
	anti-SMC-Myosin (SMMS-1)	1:50	1:40	Dako	
	anti-VE-Cadherin (TEA 1/31)	1:40	1:20	Beckman Coulter	
	anti-ICAM (MAB2130)	-	1:150	Chemicon	EDTA pH 8
	anti-TE7 (CBL271)	1:150	1:50	Millipore	
Kryoschnitte	anti-Collagen IV (CIV 22)	-	1:600 (1 h)	Dako	-
	anti-ASMA (1A4)	-	1:300 (1 h)	Dako	-
	anti-ED-A ⁺ - Fibronectin (IST9)	-	1:750 (1 h)	Santa Cruz	-

3.4.1.4 Anfertigung von Präparaten mittels Einfrieren und Schneiden am Kryotom

Die Anfertigung und Färbung der Kryopräparate erfolgte in freundlicher Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Alexander Berndt in der Pathologie Jena. Hierzu wurden nach

der Besiedlung der Scaffolds die Proben in Cryomatrix (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA) gewälzt und anschließend in flüssigen Stickstoff überführt. Die Cryomatrix diente dem Schutz der Präparate im Prozess der Kryokonservierung und ermöglichte später das Schneiden am Kryotom. Anschließend wurden beschriftete Reaktionsgefäße ebenfalls mit Stickstoff gekühlt, die Probe hierin überführt, das Reaktionsgefäß verschlossen und bis zum Versand bei -80 °C gelagert.

Der Versand erfolgte auf Trockeneis.

Die Präparate wurden am Kryotom (Leica CM 3050 S; Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Deutschland) mit einer Dicke von 3-5 µm geschnitten, auf SuperFrost®-Objektträger (Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland) aufgebracht und bis zur Färbung bei -20°C gelagert.

Die Verarbeitung von kryokonservierten PU-Proben war mit dieser Methode aufgrund der Materialbeschaffenheit und damit verbundenem Splintern des Materials beim Schneiden nicht möglich.

3.4.1.5 Hämalaun-Eosin-Färbung und Immunhistochemie an Kryoschnitten

Die Schnitte wurden langsam auf RT erwärmt und anschließend für 25 s in Methanol, dann für 8 min in eiskaltes Aceton getaucht. Die Schnitte wurden luftgetrocknet.

Hiernach erfolgte entweder eine Hämalaun-Eosin-Färbung (HE-Färbung) oder eine IHC auf die Marker Collagen IV, ASMA (engl.: *alpha smooth muscle actin*) oder ED-A⁺-Fibronektin (s.Tabelle 3-1).

Für die HE-Färbung wurden die Schnitte zunächst in *Aqua dest.* gespült und dann für 20 min in Hämatoxylin (nach MEYER: 0,5 g Hämatoxylin ü. N. in 500 ml *Aqua dest.* lösen, dann 0,1 g Natriumjodat, 25 g Kalialaun, 25 g Chloralhydrat und 0,5 g Zitronensäure zugeben) inkubiert. Das Bläuen erfolgte nach kurzem Spülen mit Leitungswasser durch Inkubation für 10 min in Leitungswasser. Darauf folgte die Färbung mit Eosin (Eosin Y, Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) durch Eintauchen der Schnitte für 1 bis 3 Minuten gefolgt von mehreren Spülschritten in einer aufsteigenden Alkoholreihe: 2 x *Aqua dest.*, 50 %, 70 %, 2 x 96 %, 100 % EtOH. Abschließend wurde jeweils für 2 min in 100 % EtOH, einem EtOH/ Xylol-Gemisch (1:1) und Xylol inkubiert und die Proben mit Pertex (Histolab Products AB, Göteborg, Schweden) eingedeckt.

Bei der IHC wurden die Schnitte zunächst zur Permeabilisierung und im Folgenden zwischen sämtlichen Inkubationsschritten 3 x mit TBS-Tween (2,25 g Tris-HCl, 17,125 g Tris-Base, 21,95 g NaCl in 2,5 l *Aqua dest.*, 2,5 ml Tween; sämtliche Reagenzien von Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) gespült.

Da der Nachweis des primären Antikörpers über die Streptavidin-Biotin-Methode erfolgte, wurde das endogene Biotin durch Inkubation mit Avidin für 10 min und anschließend mit Biotin

für weitere 10 min in der feuchten Kammer blockiert. Die Inkubationsdauer der primären Antikörper betrug 1 h bei RT.

Hiernach wurde der Antikörper mit dem „Dako REAL™ Detection System“ (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland) sichtbar gemacht. Zunächst wurden die Präparate für 30 min mit dem biotinylierten sekundären Antikörper und danach für weitere 30 min mit an alkalischer Phosphatase gekoppeltem Streptavidin inkubiert. Die abschließende Farbreaktion mit einem Chromogen-System (Chromogen Red 1, Red 2 und Red 3) machte die detektierten Zielproteine als rote Färbung sichtbar. Um endogene alkalische Phosphatasen zu blockieren, enthielt der verwendete Substratpuffer Levamisol.

Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämatoxylin für 1 min und anschließendem Bläuen in Leitungswasser für 10 min. Zum Eindecken wurde 50 °C warme Glycerol-Gelatine (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Die Auswertung der gefärbten Präparate erfolgte an dem Lichtmikroskop Axiophot 2 MOT (Kamera: AxioCam HRC; Software: Axiovision Rel. 4.6; Zeiss, Deutschland).

3.4.2 Rasterelektronenmikroskopie

Bei der Rasterelektronenmikroskopie wird die Wechselwirkung eines Elektronenstrahls mit den Elektronen des betrachteten Präparates genutzt um ein Bild der Oberfläche des zu untersuchenden Objektes mit einer sehr hohen Schärfentiefe zu erzeugen.

Die Proben wurden für diese Untersuchungsmethode nach Abschluss des Versuches mindestens 24 h in FIX II-Lösung im Kühlschrank gelagert. Für die Lösung wurden 0,75 ml 1 N HCl (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), 43 ml 25%-ige Glutaraldehydlösung (Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) und 5,65 g Natriumkakodylat Trihydrat (Na-CaCO₃, Sigma Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) vermischt und mit *Aqua dest.* auf 500 ml aufgefüllt.

Anschließend wurden die Proben in einer aufsteigenden Alkoholreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 % und 96 %) jeweils 10 min inkubiert und daraufhin in eiskaltem 99%-igem, unvergälltem Ethanol für maximal 1 h gelagert. Die Proben wurden in die Kammer des Kritischen-Punkt-Trockner (CPD 30, Bal-Tec GmbH, Schalksmühle, Deutschland) überführt und der Austausch des Alkohols gegen CO₂ erfolgte schrittweise bei 8 °C. Darauf folgte die Erwärmung des CO₂. Bei 42 °C und einem Druck von 80 bar wurde die Entlüftung der Gaskammer gestartet. Um die Proben nicht zu beschädigen, wurde das Ventil nur leicht geöffnet und die Kammer über einen Zeitraum von etwa 30 min entlüftet.

Die trockenen Proben wurden aus der Kammer entnommen, zerteilt und jeweils die Ober- und die Unterseite mit adhäsiven Karbonplättchen (Carbon Adhesive Leit-Tabs Baltic Präparation, Niesgrau, Deutschland) auf die Probenteller (Specimen stubs, 12,5 mm Bal-Tec GmbH, Schalksmühle, Deutschland) geklebt. Die Proben wurden in das Sputtergerät (Sputter

Coater, SCD 50, Bal-Tec GmbH, Schalksmühle, Deutschland) eingebracht und in einer Argon-Atmosphäre für 180 s bei 10^{-5} mbar mit Gold beschichtet.

Die Auswertung erfolgte mit dem Rasterelektronenmikroskop (EVO® LS 10; Carl Zeiss Mikrolmaging GmbH, Göttingen, Deutschland) bei 500- und bei 1000-facher Vergrößerung.

3.4.3 RNA-Expressionsuntersuchung

3.4.3.1 RNA-Isolation

Die Isolation der RNA (Ribonukleinsäure) von den besiedelten Gefäßen nach Perfusion und Pulsation sowie der nativen Gefäßstücke erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland)

Hierbei handelt es sich um ein säulenbasiertes Aufreinigungssystem, bei dem die RNA an die Membran der Säule gebunden, mehrfach gewaschen und schließlich mit Wasser eluiert wird. Hierfür wurden die besiedelten Gefäße in flüssigen Stickstoff getaucht, in ebenfalls gekühlte Kryoröhrchen überführt und bei -80 °C bis zur Aufarbeitung gelagert. Die Proben wurden in 15 ml Falcons überführt und mit 600 µl Lysepuffer gründlich gevortex (Vortex-Mixer, MS1 Mini shaker; IKA Works, Staufen, Deutschland). Anschließend wurde mit einer Spritze mit Kanüle der Lysepuffer mehrfach mit starkem Druck in das Lumen der Scaffolds gespritzt, um noch anhaftende Zellen zu lösen. Nach einem Zentrifugationsschritt (4000 U/ min, 3 min) wurde die Flüssigkeit abgenommen und auf eine QIAshredder-Säule gegeben. Durch Zentrifugation für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit wurden letzte Zellbestandteile aufgeschlossen und abgetrennt.

Das Eluat wurde mit der gleichen Menge (600 µl) 70 % Ethanol versetzt, gründlich gemischt, auf die Affinitätssäule (RNeasy spin column) aufgetragen und für 15 sec bei 8000 g zentrifugiert. Das Eluat konnte verworfen und die an die Membran gebundene RNA in mehreren Waschschritten gereinigt werden.

Schließlich wurde die RNA mit 30 µl RNase-freiem Wasser von der Säule gelöst und die Ausbeute sowie Reinheit der eluierten RNA durch Absorptionsmessung bei 260 und 280 nm am UV/ Vis-Spektrometer (Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland) überprüft. Die Ribonukleinsäure wurde bei -80 °C gelagert.

3.4.3.2 Reverse Transkription

Die gewonnene RNA wurde mit dem QuantiTect Reverse Transcription Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) in cDNA transkribiert. Hierzu wurden die Proben mit RNase-freiem Wasser auf 666 ng RNA/ Ansatz verdünnt und anschließend nach Herstellerangaben aufgearbeitet.

3.4.3.3 Quantitative Real-Time PCR

Bei der *real-time* PCR wird sich des Zusammenhangs zwischen Anfangsmenge des Templates und der Menge an PCR Produkt in jedem einzelnen Zyklus der PCR Reaktion bedient, der sich durch die Gleichung $x = 2^n$ beschreiben lässt, wobei die eingesetzte Ausgangsmenge an Template gleich 1 und x die Menge des PCR Produktes nach n Zyklen ist. Dieser Zusammenhang ist allerdings lediglich in der exponentiellen Phase der PCR gegeben, weshalb die Menge an gebildetem Template kontinuierlich gemessen werden muss. Dies erfolgt mit Hilfe des Zusatzes von SYBR-Green zum PCR Ansatz. Dieser Farbstoff bindet an doppelsträngige DNA und verändert dabei sein Fluoreszenzspektrum. Im Anschluss der Elongationsphase der PCR wird die Intensität der SYBR-Green Fluoreszenz, welche mit zunehmender DNA Menge steigt, gemessen und im Amplifikationsplot über der Zykluszahl aufgetragen.

Hieraus wird für das Zielgen und für ein sogenanntes Haushaltsgen der spezifische CT-Wert für die jeweilige Probe erhalten. Haushaltsgene sind in allen Zellen in sehr großen Mengen vorhanden und werden durch unterschiedliche Behandlung der Zellen während eines Experiments in ihrer Expressionsstärke nicht beeinflusst. Hierüber wird für jede Probe der normalisierte ΔCT -Wert über folgende Gleichung ermittelt:

$$\Delta CT = CT_{\text{Zielgen}} - CT_{\text{Haushaltsgen}} \quad (4)$$

Der normalisierte CT-Wert der behandelten Probe (ΔCT) muss anschließend mit der Referenz verglichen werden und liefert mit $\Delta\Delta CT$ die Zykluszahl n .

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT_{\text{ref}} - \Delta CT_{\text{beh}} \quad (5)$$

Daraus ergibt sich die relative Erhöhung oder Verringerung der Expression des Zielgens der behandelten Zellen im Vergleich zur unbehandelten Probe.

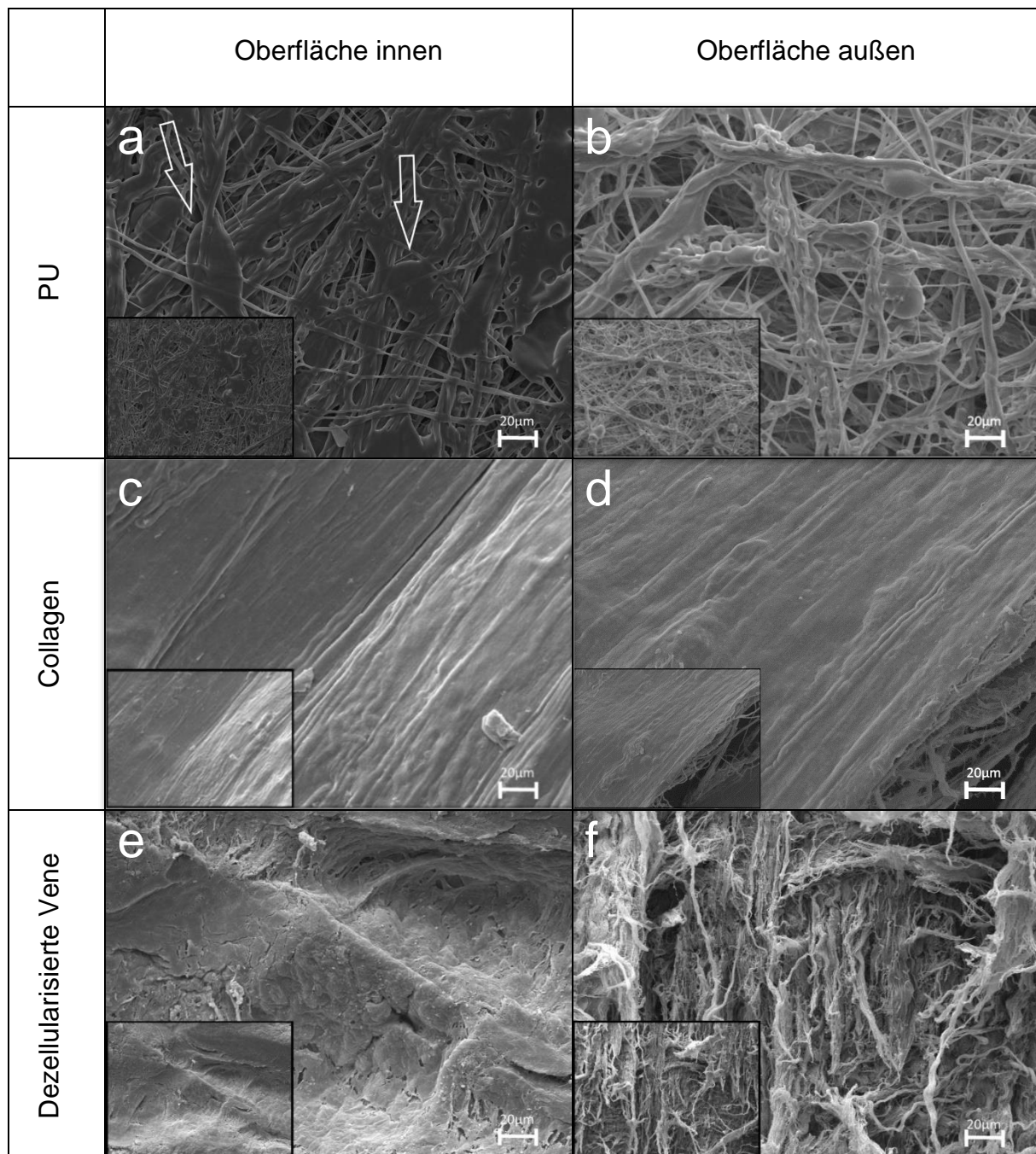
Für die Quantifizierung der Expressionslevel wurde das „QuantiFast SYBR Green PCR Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben für die *real-time* RT-PCR verwendet. Ebenso wurden die folgenden Primer käuflich erworben: GAPDH, IL1 α , IL-6, IL-8, MCP1 und VCAM1 (QuantiTect Primer Assay; Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland).

4 Ergebnisse

4.1 Untersuchung der Scaffoldmaterialien

4.1.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die vier verschiedenen Scaffoldmaterialien zur Herstellung eines TEVG wurden zunächst mittels REM analysiert (Abbildung 4-1). Es wurden deutliche Unterschiede in der Oberflächenstruktur von PU, Collagen, dezellularisierten humanen Venen und BC erkannt. Zudem erfolgte ein Vergleich mit nativem Venenmaterial:



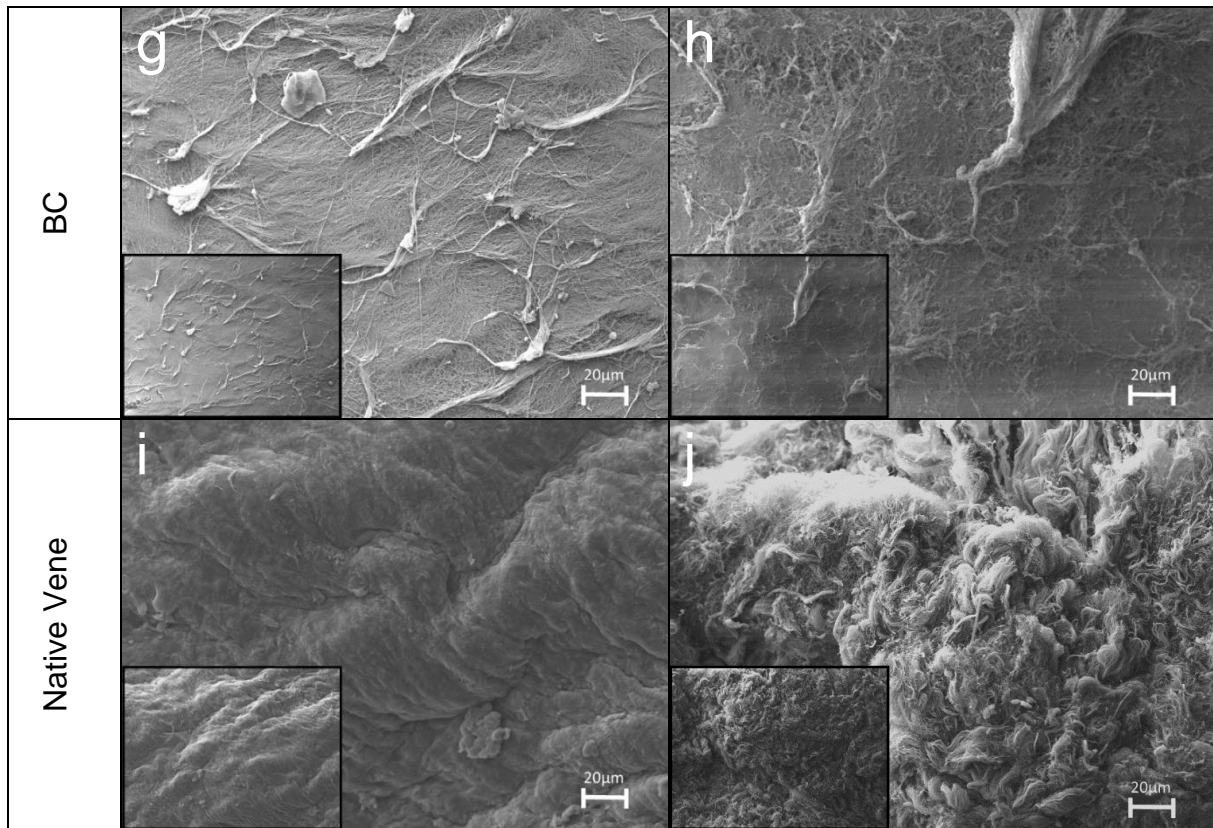


Abbildung 4-1: REM-Aufnahmen der 4 verwendeten Scaffoldmaterialien (a bis h) vor Besiedlung von innen (links) und außen (rechts), sowie von einer nativen Vene (i, j). Durch die Aufnahmen werden deutliche Strukturunterschiede zwischen PU (a, b), Collagen (c, d), dezellularisierten Venen (e, f) und Röhren aus BC (g, h) sichtbar. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

PU weist eine poröse Struktur und ein fädiges Gesamtbild auf. Durch das Sprühverfahren auf ein Negativ im Herstellungsprozess ergeben sich auf der Innenseite der Röhre sogenannte Schmelzpunkte (Abbildung 4-1, a). Die Verdickungen mit sehr glatter Oberfläche sind in der Abbildung mit Pfeilen beispielhaft hervorgehoben. Durch dieses Phänomen sind Innen- und Außenseite sehr gut zu unterscheiden. Im Gegensatz weisen die Außen- und die Innenseite der Collagenröhre (Abbildung 4-1, c und d) keine nennenswerten Unterschiede auf. Die Oberfläche ist wesentlich glatter und ohne Vertiefungen, in denen sich Zellen verankern könnten. Bei den dezellularisierten Venen sind Innen- und Außenseite eindeutig voneinander zu unterscheiden. Während im Lumen (Abbildung 4-1, e) eine vergleichsweise glatte aber strukturierte Oberfläche zu sehen ist, wird die Außenseite (Abbildung 4-1, f) durch das lockere Bindegewebe dominiert. Um zu verifizieren, ob die Vene wirklich zellfrei ist, wurde eine Färbung mit den Antikörpern CD31 und TE7 durchgeführt (vgl. Kapitel 4.1.2). Auch die BC (Abbildung 4-1, g und h) zeigt leichte Unterschiede in der Struktur von Lumen und Außenseite. Die luminale Seite wirkt kompakter. Dennoch sind auch hier Faserbündel der BC zu erkennen. Auf der Außenseite ist die Cellulose lockerer und weist mehr Vertiefungen auf. Zum Vergleich erkennt man bei der nativen *Vena saphena magna* auf der Innenseite eine Endothelzellschicht. Die Außenseite sieht kompakter aus, als die der dezellularisierten Vene.

4.1.2 Immunhistochemie

Um sicher zu stellen, dass die dezellularisierten Venen tatsächlich zellfrei sind, wurde eine unbesiedelte dezellularisierte Vene immunhistochemisch gefärbt.

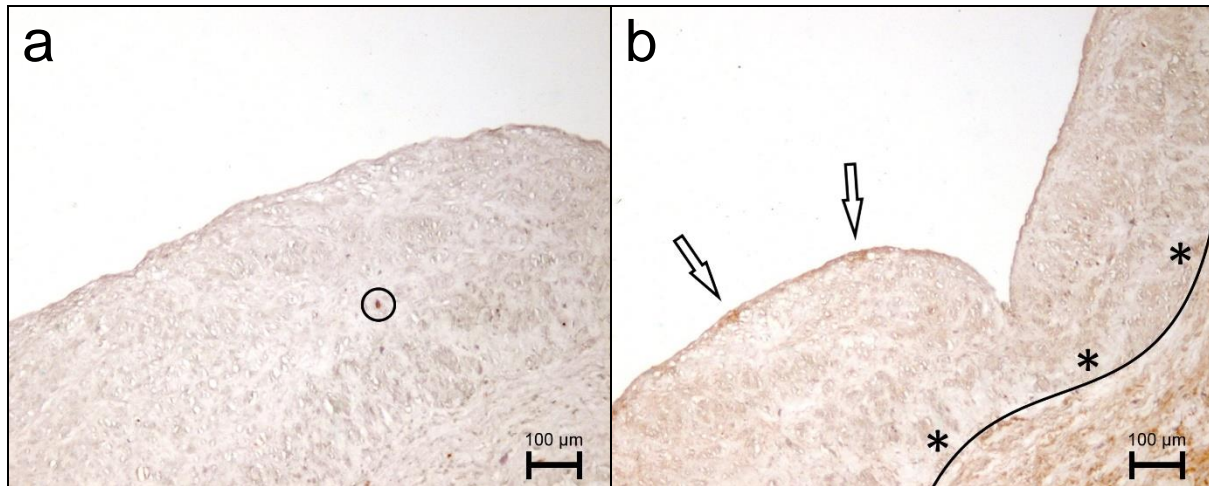


Abbildung 4-2: Immunhistochemische Färbung einer dezellularisierten Vene gegen CD31 (a) und TE7 (b). Vereinzelt sind positive Markierungen für CD31 im tiefer gelegenen Gewebe zu finden (s. Kreis), während TE7 sowohl vereinzelt auf der luminalen Seite (s. Pfeile) als auch in den tiefer gelegenen Schichten der Vene (s. unterhalb der Sterne) detektierbar ist.

Während für CD31 keine positive Markierung auf der luminalen Seite des Gefäßes zu finden ist, sind vereinzelt positive Markierungen im tiefer gelegenen Gewebe zu sehen (s. Kreis in Abbildung 4-2). Die Färbung für TE7 ist partiell vorhanden, insbesondere in den tieferen Schichten des Gefäßes (s. Sterne), aber auch an der Innenwand des Gefäßes (s. Pfeile). Es sind jedoch keine Zellkerne erkennbar, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Vene zellfrei ist.

4.2 Qualifizierung der Zellen

Um die Qualität der isolierten Zellen zu überprüfen, die zur Besiedlung der Scaffoldmaterialien mit Hilfe des BR dienen sollten, wurden diese vor der Kryokonservierung auf Multi-well-Objektträgern ausgesät und auf die unter Tabelle 3-1 aufgeführten Marker untersucht.

Exemplarisch sind in Abbildung 4-3 die Färbungen für FB und EC dargestellt. Es wurden nur Zellen verwendet, die die zelltypischen Marker und eine Reinheit von mindestens 95 % aufwiesen.

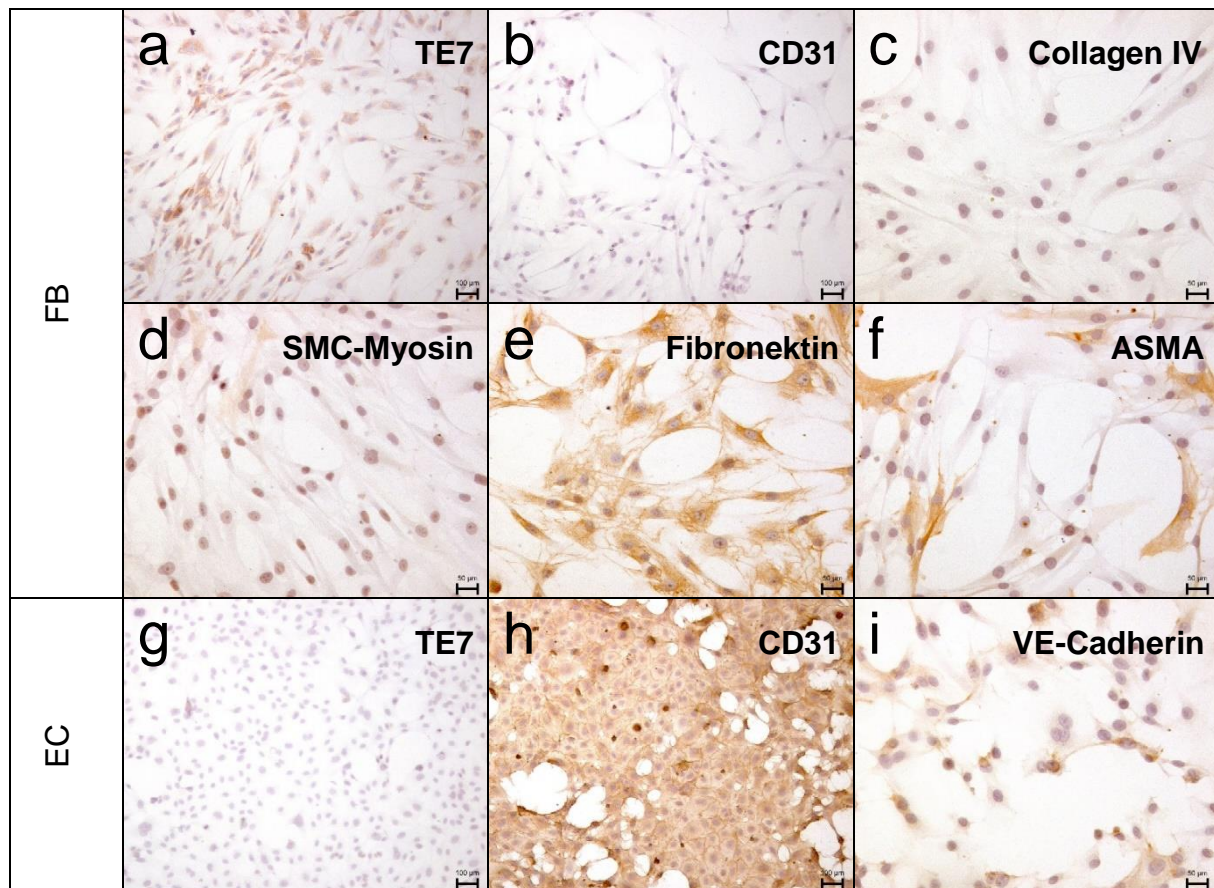


Abbildung 4-3: Immunzytochemische Färbung von FB (a-f) und EC (g-i). FB sind positiv für die Marker TE7 (a), Fibronectin (e) und ASMA (f). Eine Schwache Positivität liegt für Collagen IV (c) und SMC-Myosin (d) vor. Die EC hingegen sind negativ für TE7 (g) und positiv für CD31 (h). Eine schwach positive Markierung liegt für VE-Cadherin in EC (i) vor. Maßstabsbalken: a, b, g und h: 100 µm, c bis f und i: 50 µm

Die FB wiesen für TE7 eine positive und für CD31 eine negative Markierung auf, während die EC positiv für CD31 waren, nicht aber für TE7. Weiterhin waren die FB sehr schwach positiv für Collagen IV. Vereinzelt positive Markierungen für SMC-Myosin indizieren eine schwache Kontamination mit glatten Muskelzellen, welche für die durchgeführten Experimente jedoch nicht bedenklich waren. Darüber hinaus wiesen die FB eine starke Markierung für Fibronectin auf sowie bei ca. einem Viertel der Zellen eine starke Positivität für ASMA. Die Endothelzellen wiesen im Weiteren positive Markierungen für VE-Cadherin auf.

4.3 Umbaumaßnahmen am Bioreaktor

Nach der Untersuchung der Scaffoldmaterialien (Kapitel 4.1) und der für die Besiedlung zu verwendenden FB und EC kam der unter 3.3 beschriebene BR zum Einsatz. Bei der Verwendung des BR hatte sich schnell gezeigt, dass er, trotz der sehr guten zugrunde liegenden Überlegungen, nicht voll einsatzfähig war. Es handelte sich hierbei um einen Prototypen, dessen Testung sich auf eine Befüllung bei RT und normaler Luftfeuchtigkeit beschränkte. Darüber hinaus wurde die Rotation und Dichtigkeit des Besiedlungszyinders getestet. Eine Assemblierung der einzelnen Komponenten war jedoch nicht erfolgt und somit war auch der Betrieb bei eingeschalteter Pumpe noch nicht getestet worden.

Die in der Arbeit von Anja Friedrich getroffenen Aussagen, dass mit dem vorliegenden Bioreaktor die sterile Produktion von zwei TEVG durch simultane dynamische Besiedlung und Konditionierung unter physiologischen Bedingungen möglich sein solle [77], trafen nur bedingt zu. Im Folgenden sollen die unternommenen Schritte zur Optimierung des BR für diese Anwendung dargestellt werden (Kapitel 4.3.1 bis 4.3.5).

4.3.1 Sterilität

Das Erlernen des Umgangs mit dem BR war auf Grundlage der Arbeit von Anja Friedrich im Selbststudium gut zu bewerkstelligen. Im gesamten Zeitraum der Verwendung des BR kam es bei korrekter Bedienung des BR zu keiner Kontamination. Die Programmierung des BR wurde direkt von der Entwicklerin im Rahmen einer persönlichen Schulung vermittelt.

Auch wenn anfängliche Undichtigkeiten des BR, sowohl an den Verbindungsstellen der Schläuche als auch am Besiedlungszylinder bei eingeschalteter Pumpe keine Kontamination im Inneren des BR verursachten, war dies kein haltbarer Zustand, da Kontaminationen im Brutschrank und Korrosionseffekte am BR auftraten (Abbildung 4-4).

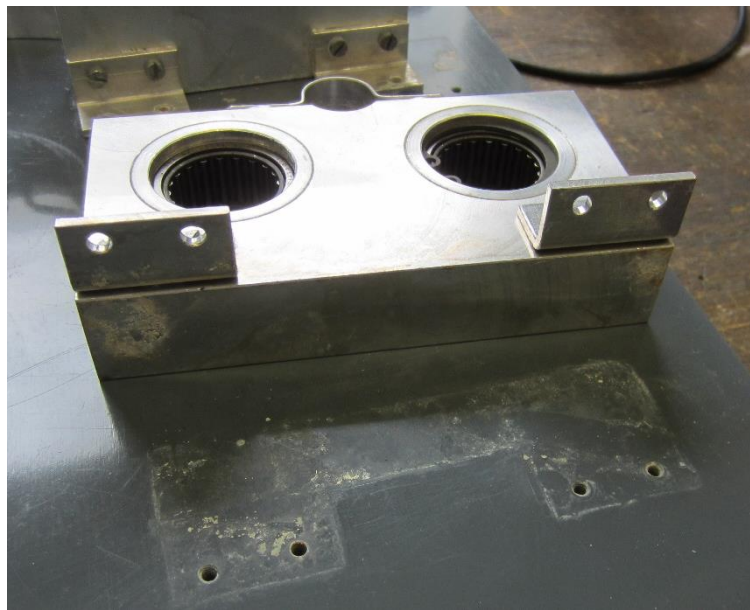


Abbildung 4-4: Durch Undichtigkeiten am BR konnte Feuchtigkeit zwischen die Bodenplatte und die angeschraubten Komponenten gelangen, was zur Korrosion führte.

Beim Besiedlungszylinder erwies sich der durchbohrte „Deckel“ des BR zur Justierung der längenverstellbaren Stäbe als Schwachstelle (vgl. Abbildung 4-5, 2 und 5). Im ersten Schritt wurden zwischen Deckel und Mutter kleine Gummi-O-Ringe eingefügt, welche aber nicht den gewünschten Erfolg brachten. Deshalb wurden die Stäbe mit Teflonband umwickelt und so die undichten Stellen abgedichtet. Hierdurch musste für jede Längenverstellung neues Teflonband verwendet werden. Da die Längen Anpassung für die hier durchgeführten Versuche nicht notwendig war, wurde schließlich gänzlich auf diese Funktion verzichtet und der Besiedlungszylinder mit der maximalen Längeneinstellung verwendet. Undichtigkeiten an den

Verbindungen zwischen Schlauch und BR-Komponenten wurden durch den Einsatz von Luer-Schlauch-Adaptoren behoben. Durch die Verwendung der Adapter vereinfachte sich darüber hinaus auch das Handling. Man konnte nun die Komponenten mittels einer Schraubbewegung verbinden und auf Kabelbinder verzichten.

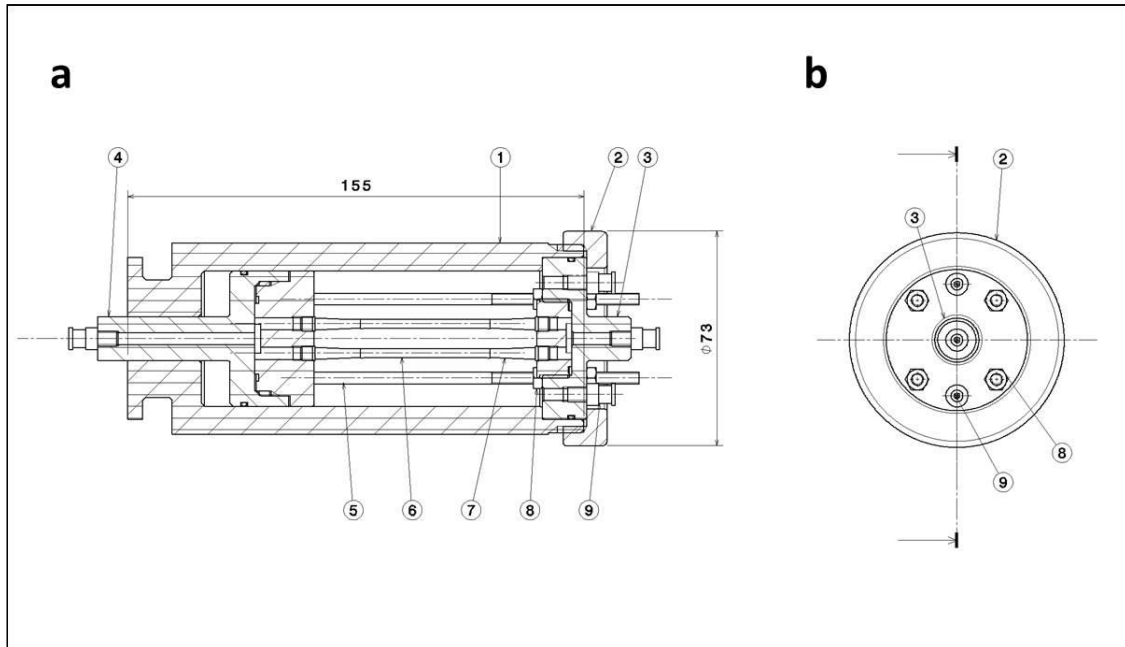


Abbildung 4-5: Querschnitt (a) und Aufsicht (b) des Besiedlungszylinders, bestehend aus einem zylinderförmigen Gehäuse (1) mit Schraubdeckel (2). Der Scaffoldhalter verfügt über einen Auslass (3) und einen Einlass (4) die mit 4 Stäben (5) adjustiert werden können. Die zwei simultan perfundierbaren TEVG (6) werden mit Gefäßkanülen (7) fixiert während die Stäbe mit Muttern aus Teflon (8) befestigt werden. Luer-Lock-Adapter (9) ermöglichen eine einfache Handhabung zur Befüllung des Zylinders und zur Verbindung mit dem Schlauchsystem (aus [82]).

4.3.2 Parallele Besiedlung von zwei TEVGs

Um wie geplant die simultane Prozessierung von zwei TEVGs zu bewerkstelligen, mussten andere Gefäßkanülen verwendet werden. Die ursprünglich geplanten Adapter (Abbildung 4-6, oben) erlaubten nur eine Besiedlung von ca. 1 cm der 6 cm langen Scaffolds auch im voll ausgefahrenen Modus, so dass kürzere Kanülen eingesetzt werden mussten (Abbildung 4-6, unten)

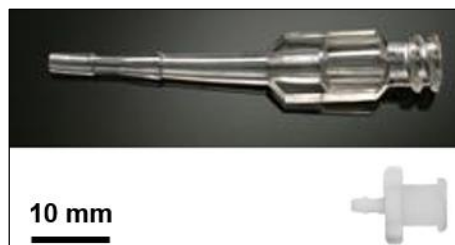


Abbildung 4-6: Darstellung des ursprünglich angedachten Adapters zur Befestigung der Venen im Besiedlungszylinder (oben, Surge Cardiovascular, Bild von www.surgecardiovascular.com) gegenüber dem schließlich verwendeten Adapter (unten, Vieweg Dosier- und Mischtechnik, Bild von www.dosieren.de).

4.3.3 Dynamische Besiedlungsbedingungen

Zur dynamischen Besiedlung der TEVG war die programmierbare Rotationsfunktion des Besiedlungszylinders vorgesehen. Während die Rotation bei RT und geringer Luftfeuchtigkeit problemlos funktionierte, war dies im Brutschrank, insbesondere mit angeschlossenen Schläuchen, trotz rotierbarer Anschlüsse nicht der Fall.

Durch die Feuchtigkeit wurde die Reibung zwischen Zylinder und Gummiauflagen auf den rotierenden Walzen zu schwach. Darüber hinaus sorgten die Feuchtigkeit und kleine Leckagen am BR dafür, dass die Nadellager der Walzen verkalkten. Dies führte bei der hinteren Walze, welche nicht mit einem Keilriemen verbunden war und nur passiv über die Rotation des Zylinders angetrieben werden sollte, zum Stillstand und blockierte schließlich auch den Besiedlungszylinder.

Es wurden daraufhin andere Lager, beidseitig geschlossene Kugellager, eingesetzt. Außerdem wurde der Besiedlungszylinder im Folgenden bereits am Tag vor der Besiedlung mit Medium befüllt und im Brutschrank vorinkubiert. Das sich durch den Temperaturunterschied bildende Kondenswasser konnte anschließend vor dem Aufsetzen auf den Mixer abgewischt werden, wodurch die Reibungsverluste reduziert wurden. Diese Maßnahmen behoben das Problem jedoch nicht vollständig.

Eine weitere Überlegung war, den Druck des Zylinders auf die Walzen, und so die Reibung, zu erhöhen. Manuelle Tests zeigten, dass dieser Druck sehr exakt justiert werden musste um nicht ein erneutes Blockieren durch zu starken Druck zu verursachen oder durch zu schwachen Druck keinen Effekt zu erzielen. Somit wurde dieser Ansatz verworfen. Schließlich wurde die hintere Walze über einen weiteren Keilriemen mit der vorderen Walze verbunden (Abbildung 4-7), um so die Kraft auf beide Walzen zu übertragen. Die durch die hintere Walze verursachte Schwergängigkeit wurde behoben und die Rotation funktionierte zuverlässig.

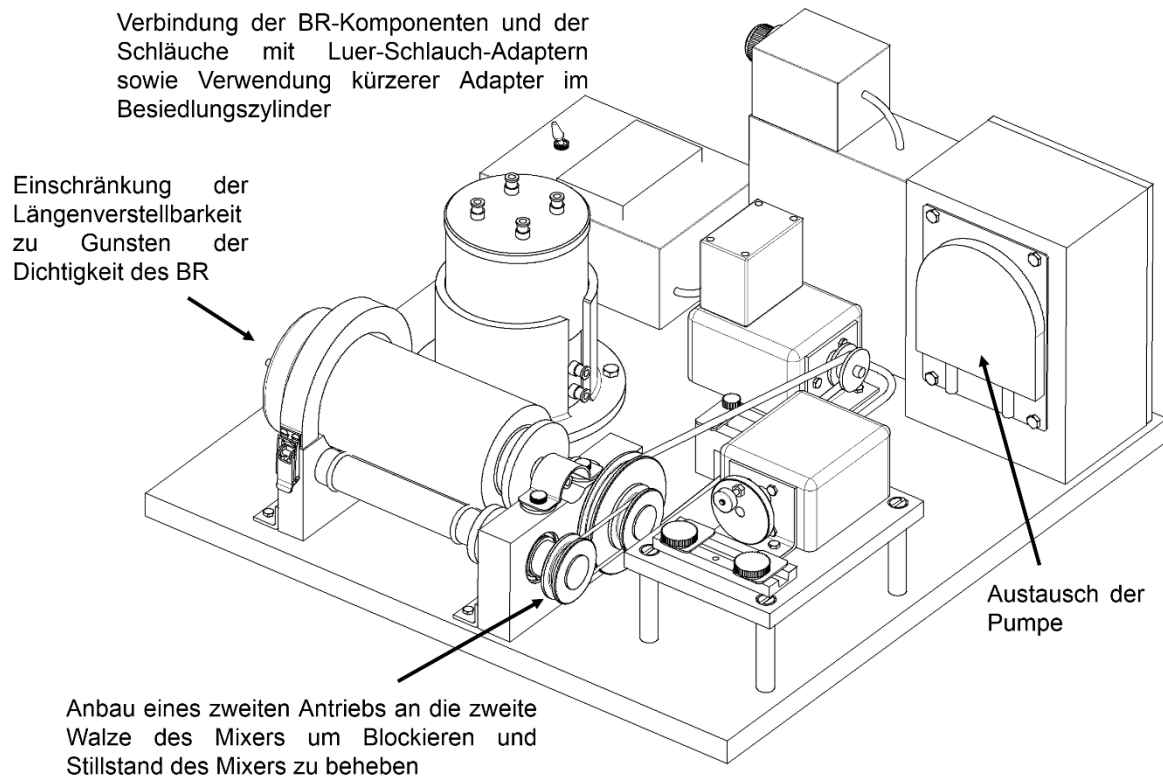


Abbildung 4-7: Isometrische Darstellung des Aufbaus des Bioreaktors mit Hinweis auf die notwendigen Umbaumaßnahmen für einen fehlerfreien Betrieb des BR

4.3.4 Konditionierung der TEVGs und Austausch der Pumpe

Die Konditionierung der Zellen sollte durch einen kontinuierlichen Medienstrom sowie durch einen regelmäßig gesetzten Puls erfolgen. Hierfür besaß der BR eine Rollerpumpe sowie einen Pulser, welcher den Schlauch unmittelbar vor dem Besiedlungszyylinder in regelmäßigen zeitlichen Abständen abklemmte.

Der Pulser funktionierte zuverlässig mit einer Frequenz von 60 bpm. Lediglich bei einem Versuchslauf wurde der Schlauch während des Laufs durch den Pulser beschädigt. Dies war auf Materialermüdung der Schläuche wegen mehrfacher Verwendung und Sterilisation zurückzuführen. Daraufhin wurden die Schläuche nach max. zwei Einsätzen entsorgt und neue Schläuche verwendet.

Auch die verwendete Rollerpumpe erzeugte einen Puls, welcher aber sehr gering ausfiel (vgl. Abbildung 4-8), womit sich der Nutzen des Pulsers bestätigte.

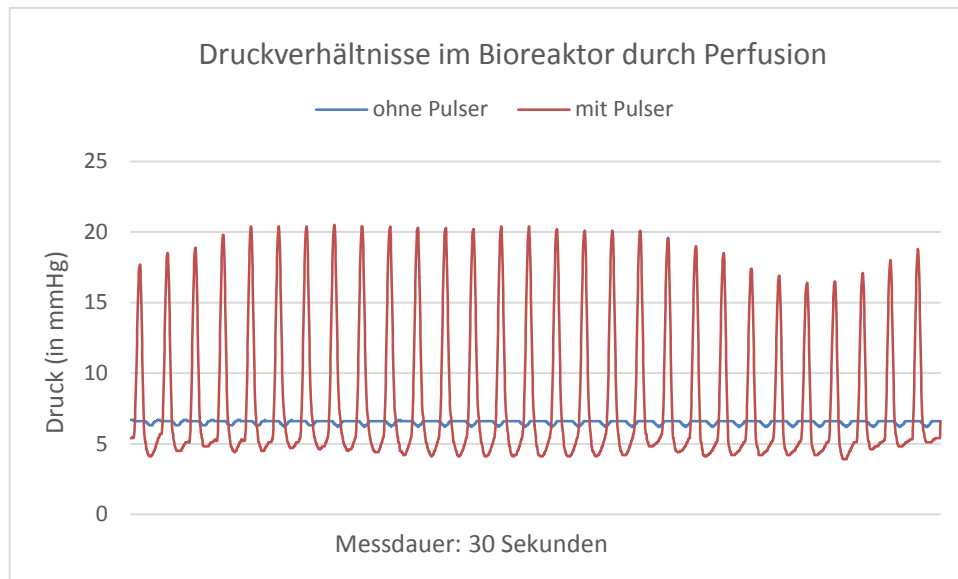


Abbildung 4-8: Messung der Druckverhältnisse im BR am Luer-Lock-Anschluss zum Scaffold bei einer Perfusion mit 12 ml/ min. Durch die Verwendung des Pulsers ergeben sich starke Druckunterschiede (rot), während ohne Einsatz des Pulsers nur sehr geringe Druckschwankungen auftreten (blau). Die Druckkurve mit Pulser erinnert an Systole und Diastole unter physiologischen Bedingungen.

Der eingesetzte Medienstrom von wenigstens 12,5 ml/ min hingegen erwies sich als zu stark für die Konditionierung, da die Zellen nicht ausreichend verankert waren und durch den starken Scherstress abgelöst wurden (vgl. Kapitel 4.5).

Im Datenblatt der Pumpe wird angegeben, dass diese je nach Schlauchdurchmesser mindestens 10 ml/ min pumpt. Eine manuelle Messung des Durchflusses ergab beim kleinsten einzustellenden Durchfluss einen Wert von 12,5 ml/ min (750 ml/ h), was einem Wert von 100 dyn/ cm² entspricht. In der Literatur [37], [83], [84] werden für kleine Gefäße und auch für die Entwicklung von TEVG deutlich niedrigere Werte angegeben.

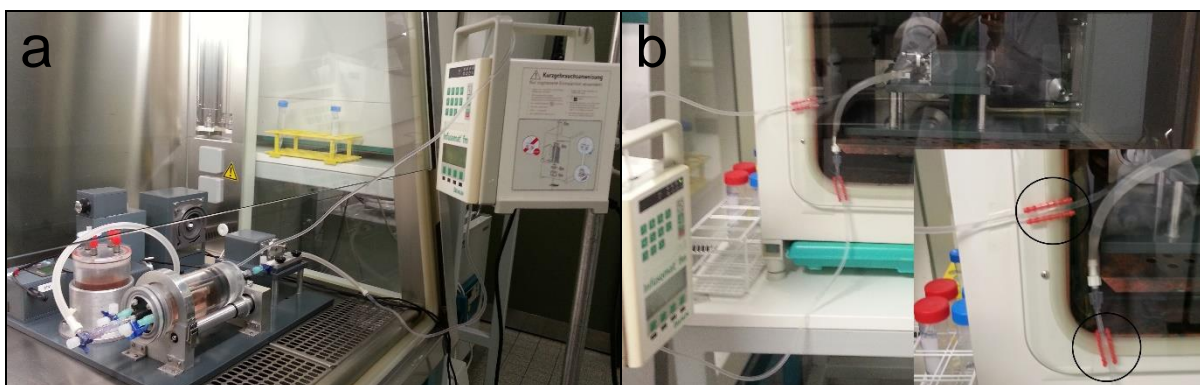


Abbildung 4-9: Verbindung des BR mit einem Infusomat an Stelle der ursprünglich verwendeten Pumpe von Welco. Der Aufbau des BR in der Sterilwerkbank (a) erfolgte wie mit der anderen Pumpe. Um die Schläuche nicht in der Dichtung des Brutschanks abzuklemmen, wurden an der Tür Abstandshalter (siehe Kreise, b) installiert.

Um einen geringeren Medienstrom zu erreichen, wurde schließlich ein Infusomat anstelle der bisherigen Pumpe an den BR angeschlossen (Abbildung 4-9). Hiermit ließen sich geringere Werte einstellen. Es wurde hierdurch allerdings der Vorteil aufgehoben, dass der gesamte BR komplett im Brutschrank unterzubringen ist.

Für die Testung des BR war dieser Aufbau ausreichend, im Folgenden sollte aber eine passende Pumpe implementiert werden (s. Kapitel 5.1).

4.3.5 Vereinfachtes Handling

Neben den oben genannten notwendigen Eigenschaften des BR sollte auch das Handling einfach und anwenderfreundlich sein. Vom ursprünglichen Gedanken, die Schläuche mit Kabelbindern an die einzelnen BR-Komponenten anzuschließen, wurde schnell abgesehen. Hiermit konnte keine Dichtigkeit gewährleistet werden (s. Kapitel 4.3.1) und die Besiedlung der Scaffolds mit Zellen wäre durch potentielle Leckagen schwierig und fehleranfällig geworden. Neben den Luer-Schlauch-Adaptern wurden an mehreren Stellen (vgl. Abbildung 4-10) 3-Wege-Hähne eingesetzt. Dies vereinfachte das Befüllen des BR, das Absaugen von Luft im System sowie die Besiedlung. Außerdem wurde ein Abknicken und Verdrehen des Schlauchs zwischen Besiedlungszylinder und Mediumreservoir verhindert.

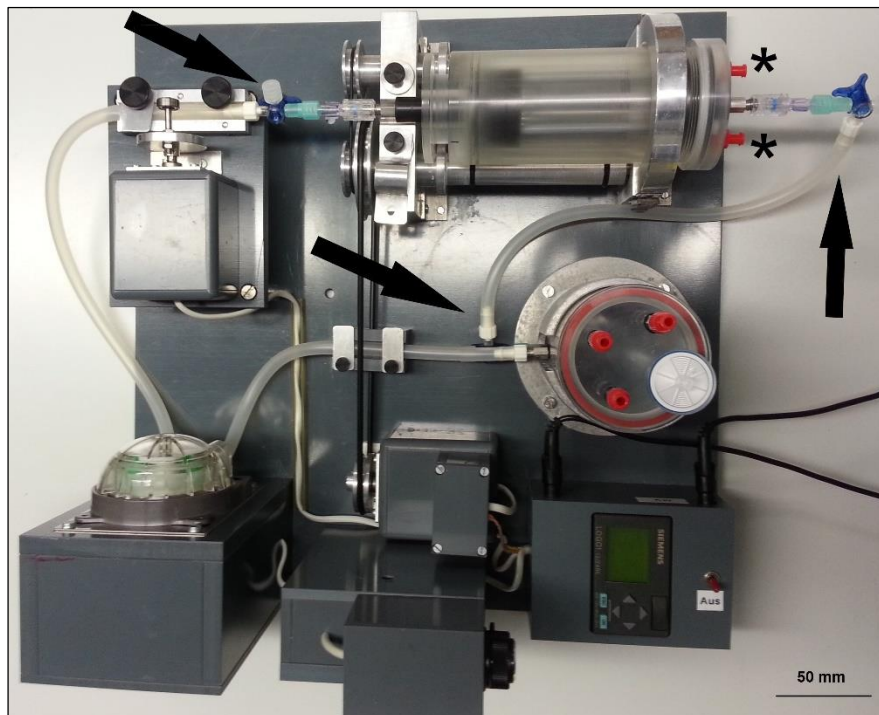


Abbildung 4-10: Finale Verbindung der einzelnen Komponenten des BR mit Schläuchen unter Verwendung der ursprünglichen Pumpe. Neben den hier sichtbaren 3-Wege-Hähnen (Pfeile) wurden die roten Verschlusskappen am Besiedlungszylinder auch durch 3-Wege-Hähne ersetzt (Sterne), was das Befüllen und Entlüften deutlich vereinfachte.

Des Weiteren war das Einfügen des Scaffoldhalters in den Besiedlungszylinder äußerst schwergängig. Hierfür wurde der Zylinder minimal aufgefräst, so dass er dicht blieb, aber das Zusammenstecken und Zerlegen erleichtert wurde.

4.4 Besiedlungsversuche ohne Fluss

4.4.1 Polyurethan

Da PU bereits erfolgreich in unserer Arbeitsgruppe in Form von Herzklappen besiedelt wurde, wurden keine entsprechenden Vorversuche ohne BR durchgeführt. Stattdessen wurde direkt der BR verwendet und die PU-Röhre mit einer Zellzahl von 750 000 Zellen/ cm² besiedelt. Exemplarisch sind in Abbildung 4-11 Bilder von im BR besiedelten PU-Röhren dargestellt.

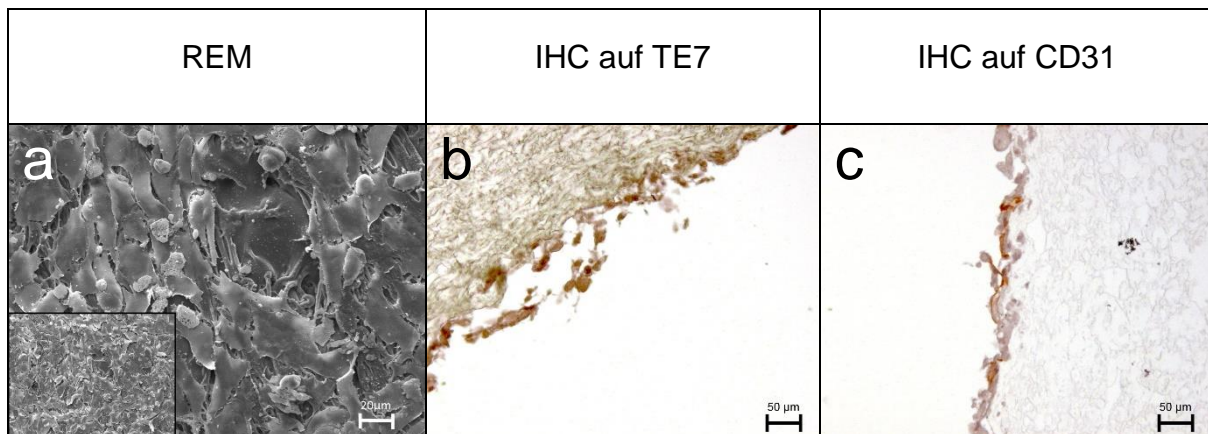
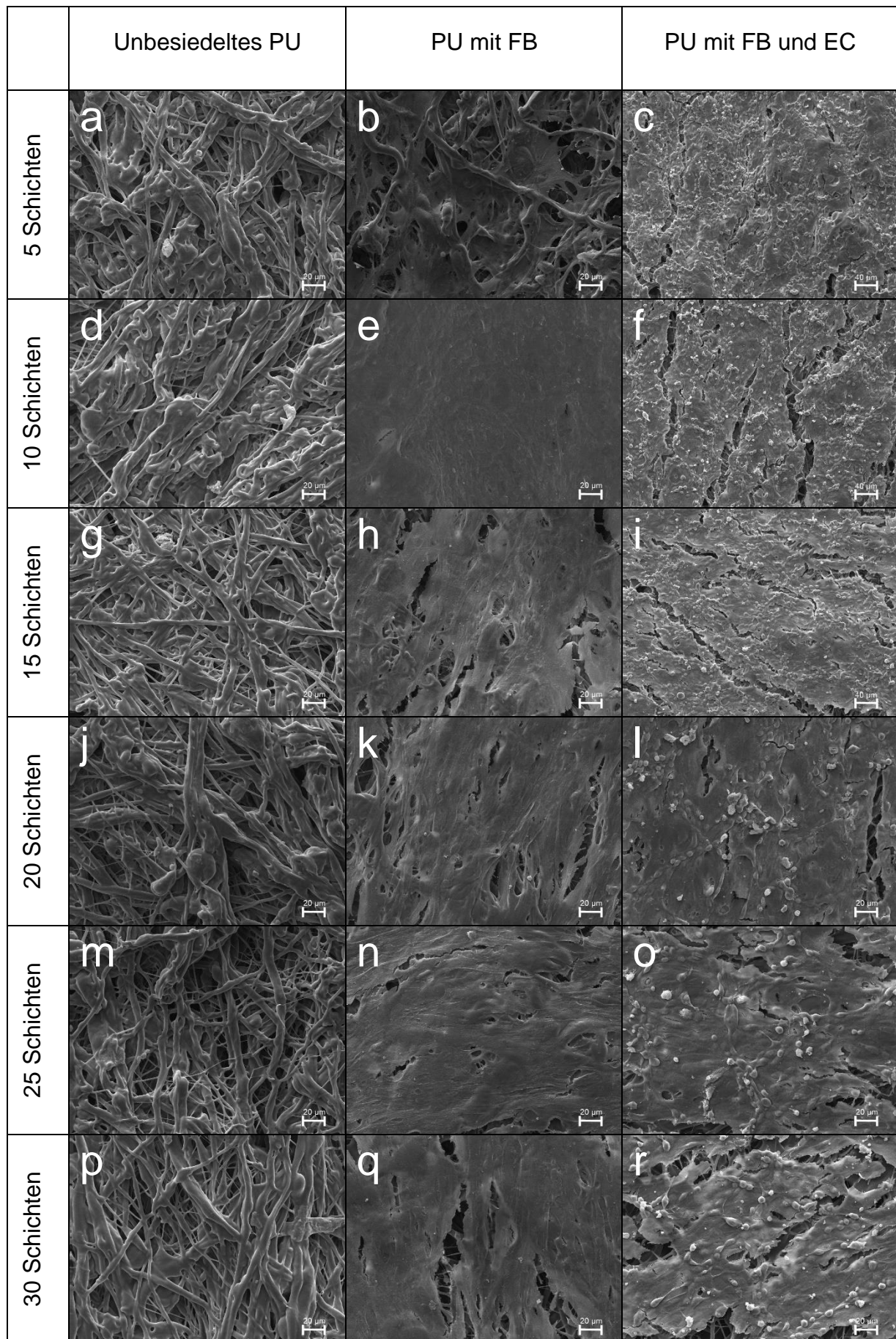


Abbildung 4-11: REM-Aufnahmen (a) und immunhistochemische Färbungen (b, c) der besiedelten PU-Röhren. PU war im Bioreaktor ohne Fluss gut zu besiedeln, es zeigte sich aber, dass die Zellschicht wenig adhärent war und die EC keinen pflastersteinförmigen Monolayer ausbildeten. Auch lösten sich die Zellen teilweise vom Scaffold. Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Die Zellen bedecken in allen Versuchsläufen annähernd vollständig das Scaffold und Markierungen sowohl für TE7 als auch für CD31 zeigten die Adhärenz von FB und EC an. Ein glatter Monolayer aus EC, wie man ihn von gesunden Gefäßen kennt, wird jedoch nicht ausgebildet. Die Zellen scheinen nur locker angelagert zu sein und lösen sich teilweise wieder ab (vgl. Abbildung 4-11).

4.4.1.1 Verschiedene Schichtdicken von PU

Da im Laufe der Arbeit erkannt wurde, dass die PU-Röhren mit 80 Schichten wenig flexibel und nachgiebig sind und so von einer geringen Compliance ausgegangen werden muss, wurden weitere PU-Scaffolds mit weniger Schichten (5, 10, 15, 20, 25, 30 und 35) sowohl unbesiedelt, als auch mit Zellen besiedelt mittels REM untersucht, und das Handling damit überprüft.



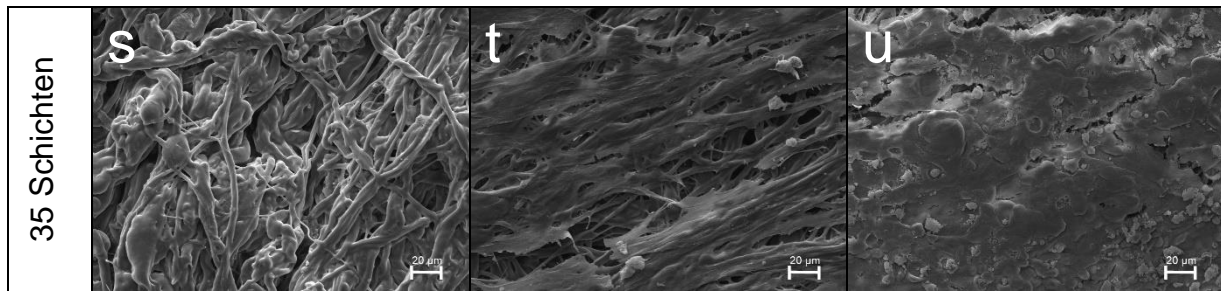


Abbildung 4-12: REM-Aufnahmen von PU-Proben mit verschiedenen Schichtdicken. Unabhängig von der Schichtdicke wies PU eine vergleichbare Morphologie im unbesiedelten Zustand (links) auf. Auch ließ sich das PU bei jeder Schichtdicke sowohl mit FB (Mitte), als auch mit FB und EC (rechts) besiedeln. Vergrößerung: 1000-fach.

Es zeigte sich, dass das PU unabhängig von der Schichtdicke eine vergleichbare Struktur aufwies (Abbildung 4-12, links) und darüber hinaus ausgezeichnet sowohl mit FB (Mitte) als auch mit FB und EC (rechts) zu besiedeln war.

Einen vollständig konfluenten FB-Layer sowie eine vollständige Besiedlung mit FB und EC wurden bei einer Schichtanzahl von 10 erzielt (e und f). Risse in der Zellschicht gehen auf Trocknungsartefakte im Laufe der Probenaufarbeitung zurück und zeigen kein mangelhaftes Besiedlungsverhalten an. Da die Handhabung der Scaffolds im Herstellungsprozess bei einer Schichtanzahl von unter 20 aber sehr schwierig war, wurde PU mit 20 Schichten für die abschließenden Perfusionsexperimente (Kapitel 4.6) verwendet.

4.4.2 Collagen

Zu Beginn der Untersuchungen wurden *Collagen Cell Carrier* (CCC) mit FB besiedelt. REM-Aufnahmen (Abbildung 4-13) deuten darauf hin, dass die Zellen eine Vorzugsrichtung aufweisen und eine eher spindelförmige Morphologie annehmen. Dies entspricht mehr den FB *in vivo* als die sonst übliche Gestalt von auf Plastik kultivierten Zellen.

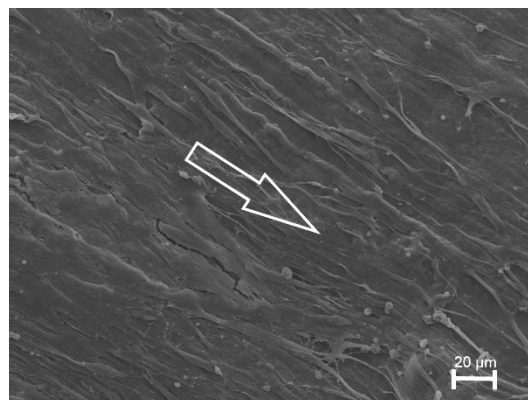


Abbildung 4-13: REM-Aufnahme eines unter statischen Bedingungen mit FB besiedelten CCC. Die Zellen weisen eine Vorzugsrichtung (in Pfeilrichtung) auf. Vergrößerung: 1000-fach.

Im weiteren Verlauf wurden 3 x 2 Collagen-Röhren im BR ohne Fluss besiedelt. Nach der adäquaten Besiedlung der CCC war der Besiedlungserfolg bei den Collagen-Röhren nicht zufriedenstellend. Für REM-Aufnahmen wurde die besiedelte Röhre aufgeschnitten und auseinander gebogen, um Aufnahmen vom Lumen machen zu können. Hierbei platzte beim

ersten Versuch die Zellschicht ab (Abbildung 4-14, a, Übersichtsbild). Doch auch in den weiteren Versuchen wurde keine vollständige Besiedlung der Collagenröhren erreicht (Abbildung 4-14, d und g). Die Ergebnisse wurden durch die IHC bestätigt. Eine Markierung mit TE7 ist nur vereinzelt bei Versuch 2 (Abbildung 4-14, e) auszumachen, während CD31 zumindest in Versuch 3 (Abbildung 4-14, i) stark nachweisbar ist und auf eine adäquate Besiedlung mit EC hinweist. Darüber hinaus war das Collagen sehr fragil und riss leicht (vgl. Abbildung 4-14, h und i).

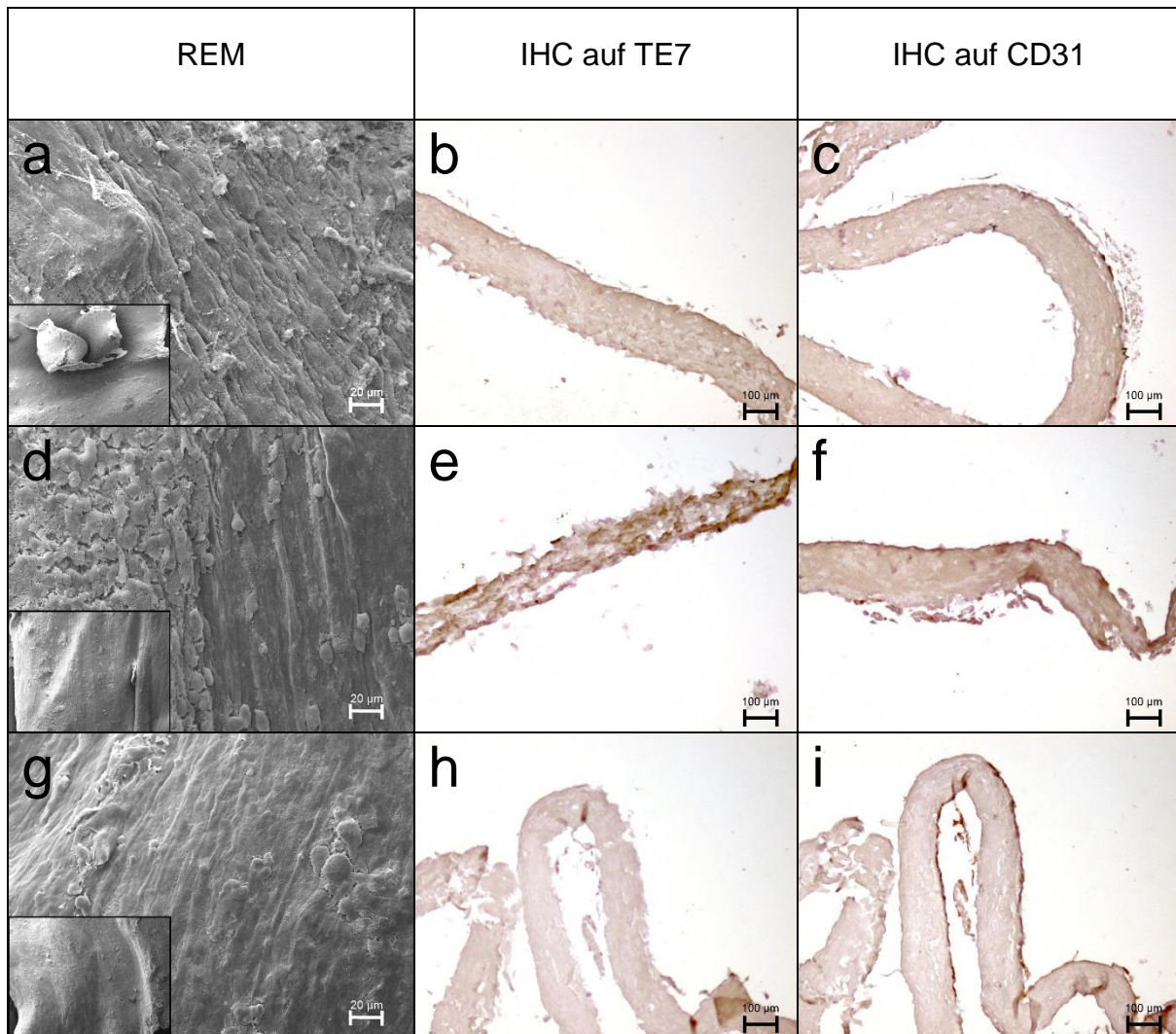


Abbildung 4-14: REM-Aufnahmen (a, d und g) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f, h, i) von besiedelten Collagen-Röhren in 3 verschiedenen Versuchsdurchläufen (1 = a-c, 2 = d-f, 3 = g-i). Die Besiedlung erwies sich in allen Versuchen als unvollständig. Darüber hinaus zeichnete sich das Material durch eine geringe Reißfestigkeit aus und konnte schnell beschädigt werden. Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

4.4.3 Humane dezellularisierte Venen

Da von den dezellulierten Venen nur begrenzt Material zur Verfügung stand, wurden die Röhren direkt mit dem BR verwendet. Auch hier handelte es sich wiederum um einen 3-fach-Ansatz mit jeweils 2 besiedelten Röhren pro Lauf.

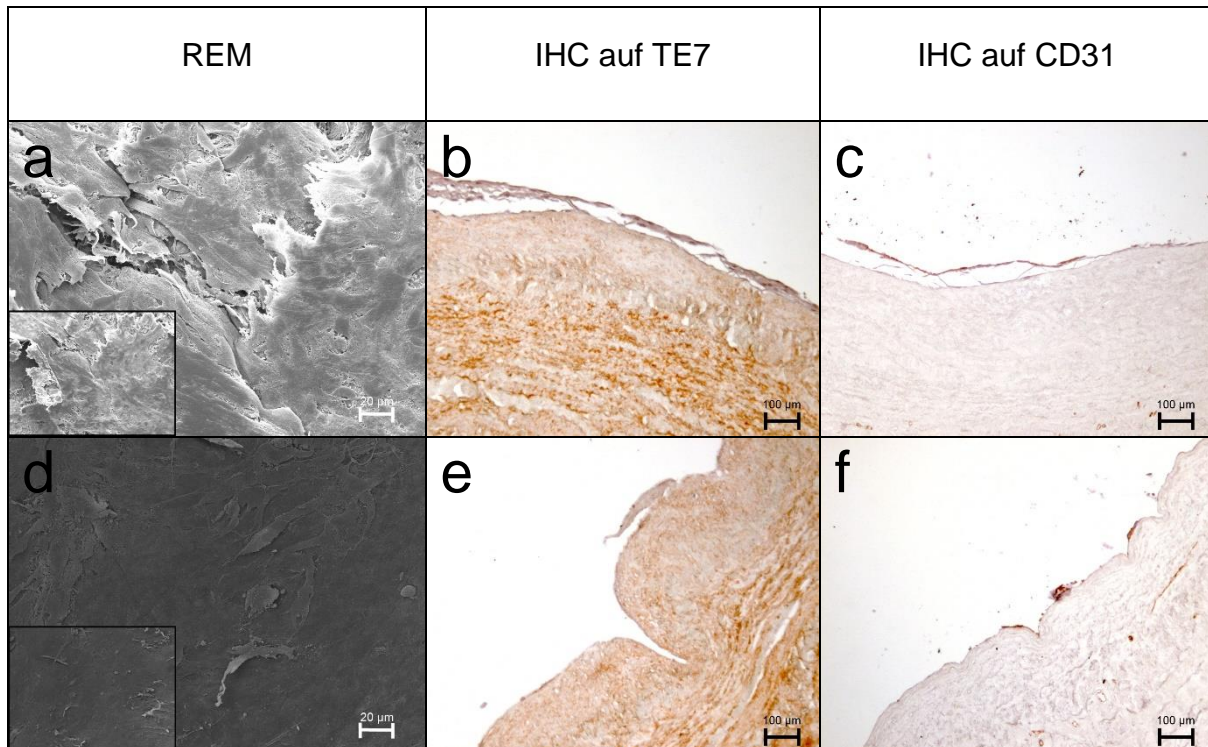


Abbildung 4-15: REM-Aufnahmen (a, d) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f) von im BR rebesiedelten dezellularisierten Venen. Es ist ein Beispiel für einen verhältnismäßig guten Besiedlungserfolg der dezellularisierten Vene (a-c), sowie für eine schlecht bis gar nicht besiedelte Vene (e-f) dargestellt. Der Zellverband löste sich allerdings auch bei der gut besiedelten Vene im Laufe der Präparation wieder ab (vgl. b, c). Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Teilweise bildeten die Zellen, wie in Abbildung 4-15 dargestellt, einen Zellverband, lösten sich aber wieder vom Scaffold (a-c). Darüber hinaus zeigte sich bei den REM-Aufnahmen Trocknungsartefakte (a), was auf den höheren Wassergehalt des Gewebes zurückzuführen ist. Hierdurch schrumpfte der Untergrund der Zellen stärker zusammen und die erhöhte Spannung führte schließlich zu Rissen im Zellverband.

Des Weiteren waren Stellen des Materials zum Teil gar nicht besiedelt. Da der Herstellungsprozess der Venen aus patentrechtlichen Gründen nicht einsehbar war, konnten auch keine Rückschlüsse auf die Ursache für die schlechte Besiedlungseffizienz gezogen werden. Daher wurde die Rebesiedlung der dezellularisierten Venen mit dem BR nicht weiter verfolgt und stattdessen mit den übrigen 3 Materialien gearbeitet.

4.4.4 Bakterielle Cellulose

Vergangene Untersuchungen mit BC des Herstellers Xellutec innerhalb der Arbeitsgruppe hatten wenig Besiedlungserfolg gezeigt (unveröffentlichte Daten). Da der Hersteller aber seinen Herstellungsprozess optimiert hatte, wurde zunächst die prinzipielle Besiedelbarkeit anhand von Patch und Röhre überprüft.

Es zeigte sich, dass sowohl auf den Patches (Abbildung 4-16, oben), als auch auf den aufgeschnittenen Röhren (Abbildung 4-16, unten) Zellen adhärirten.

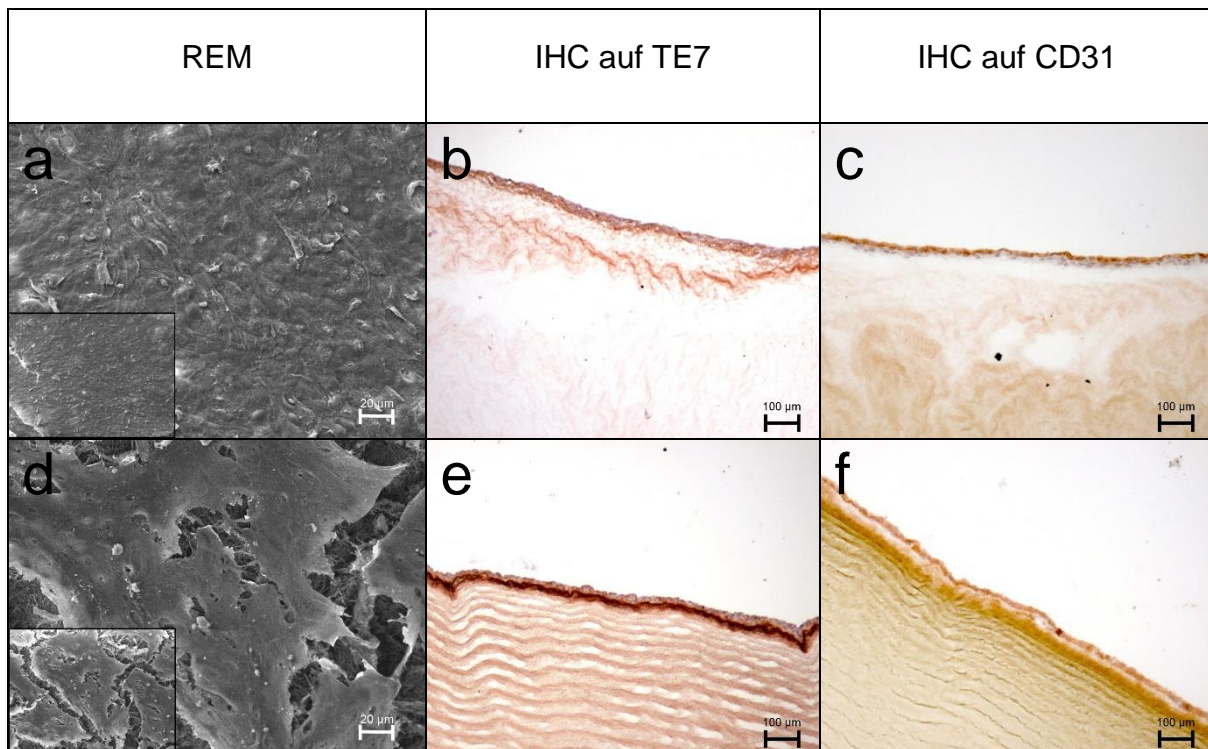


Abbildung 4-16: REM-Aufnahmen (a, d) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f) von besiedelter BC. Die Besiedlung war sowohl in Form eines Patches (a - c), als auch in Form der Röhre (d bis f) möglich. Es bildeten sich geschlossene Monolayer, welche bei den aufgeschnittenen Röhren aber durch die Probenvorbereitung fürs REM Risse bekamen (siehe d). Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Es fand keine Invasion der Zellen in das Material hinein statt. Dafür war in der IHC zu erkennen, dass sich die FB und EC ausschließlich als Monolayer auf der BC anlagerten.

Im REM sind, ebenso wie bei den dezellularisierten Venen (4.4.3), Risse im Zellrasen zu erkennen. Dieses Phänomen trat bei den Röhren stärker auf als bei den Patches und ist auf den hohen Wassergehalt des Materials von bis zu 99 % zurückzuführen. Auch hier kommt es zum Schrumpfen des Materials im Verlauf der Kritisch-Punkt-Trocknung. In der IHC hingegen ist eine vollständige Besiedlung sowohl beim Patch, als auch bei der Röhre zu sehen. Trotz der starken Hintergrundfärbung des Materials ist die Abgrenzung zum Zelllayer möglich.

4.5 Etablierung des Perfusionsprotokolls

Nachdem die zur Besiedlung geeigneten Scaffoldmaterialien ermittelt waren, wurde das Perfusionsprotokoll zur Konditionierung der Zellen etabliert. Hierfür wurden die PU-Röhren verwendet, da diese sowohl in größerem Umfang vorhanden waren und reproduzierbare Ergebnisse geliefert hatten.

Die erste Besiedlung mit Perfusion zeigte mangelhaften Erfolg. Die REM-Aufnahmen zeigten maßgeblich das native Material und vereinzelt abgerissene Zellflächen (Abbildung 4-17, a). Es war anzunehmen, dass der Durchfluss von 18 ml/ min, welcher von der Pumpe zu Beginn generiert wurde, zu stark war. Es folgten Versuche mit geringerem Fluss, welcher sich aber mit 12,5 ml/ min weiterhin als zu hoch herausstellte.

Zellen blieben nur an vereinzelten Stellen des Scaffolds haften und waren in Flussrichtung ausgerichtet (Abbildung 4-17, b).

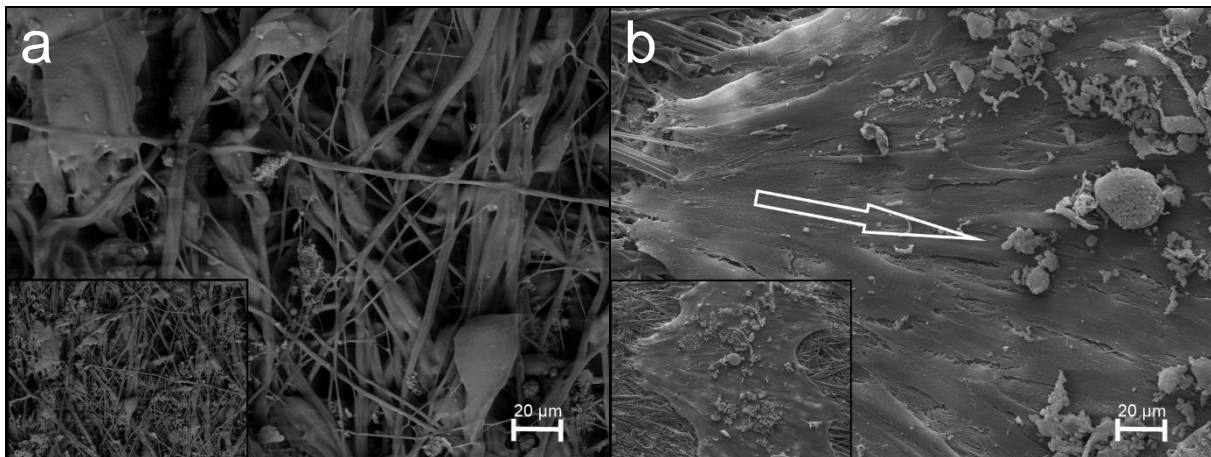


Abbildung 4-17: REM-Aufnahmen der unter Fluss besiedelten PU-Röhren. Während bei hohem Fluss mit 18 ml/ min (a) keine Zellen am Material adhären konnten, blieben beim minimal einstellbaren Fluss von 12,5 ml/ min (b) vereinzelt Zellen am Scaffold haften und wiesen eine starke Ausrichtung in Flussrichtung (s. Pfeil) auf. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Zum Zweck der Besiedlung von Gefäßprothesen mit Zellen war der BR mit dem ursprünglichen Setup (mit Welco-Pumpe statt Infusomat, vgl. Kapitel 4.3.4) nicht zu verwenden, so dass die in Kapitel 4.3 beschriebenen Umbaumaßnahmen durchgeführt wurden.

Auch mit dem im Klinikbetrieb gebräuchlichen Infusomat wurden verschiedene Flüsse, basierend auf Werten aus der Literatur [37], [83], [84], ausgetestet.

Beim ersten Versuch erfolgte noch keine Konditionierung der FB allein. Der maximale Scherstress betrug 30 dyn/ cm² und die Pulsation wurde 48 h nach der EC-Aussaat gestartet. Die gesamte Versuchsdauer betrug 7 d. Bei der Aussaat der EC 24 h nach der Besiedlung mit FB, wurde aus einem der besiedelten Scaffolds eine Röhre von FB ausgespült, welche in Abbildung 4-18 (a) dargestellt ist. Es handelt sich um mehrere Lagen von FB welche in Form einer Röhre fusioniert sind und offenbar keine ausreichende Adhärenz am Scaffold ausgebildet hatten, was zur Ablösung während des Einspritzens der EC führte.

Auch wurde angenommen, dass die Einsaat von EC bereits 24 h nach Besiedlung des Scaffolds mit FB, zu früh war.

Zudem schien die Nährstoffversorgung der Zellen nicht über den gesamten Versuchszeitraum ausreichend zu sein, da die Zellen bei der Ernte des TEVG bereits wieder abstarben (vgl. Abbildung 4-18, b). Die bereits stark gelbliche Farbe des Mediums war ein weiterer Indikator für eine Unterversorgung der Zellen mit Nährstoffen.

Schließlich war die Pumpe mehrfach durch die Bildung von Luftblasen im Schlauchsystem stehen geblieben, so dass kein kontinuierlicher Scherstress generiert werden konnte und die Konditionierung der EC unvollständig war. Dies wurde in weiteren Versuchen durch Abziehen der Luft über einen der verwendeten 3-Wege-Hähne (Abbildung 4-10) behoben.

Für die Entwicklung von Prothesen ohne Trägermaterial könnte es interessant sein das Zufallsergebnis der FB-Röhre näher zu untersuchen. Wenn durch weitere Konditionierung die Entwicklung eines entsprechend stabilen Transplantates möglich ist, könnte dies für den Einsatz bei Kindern zielführend sein. Auf eine weitere Untersuchung wurde jedoch verzichtet, da der Fokus dieser Arbeit auf der Besiedlung verschiedenen Scaffoldmaterialien im BR lag.

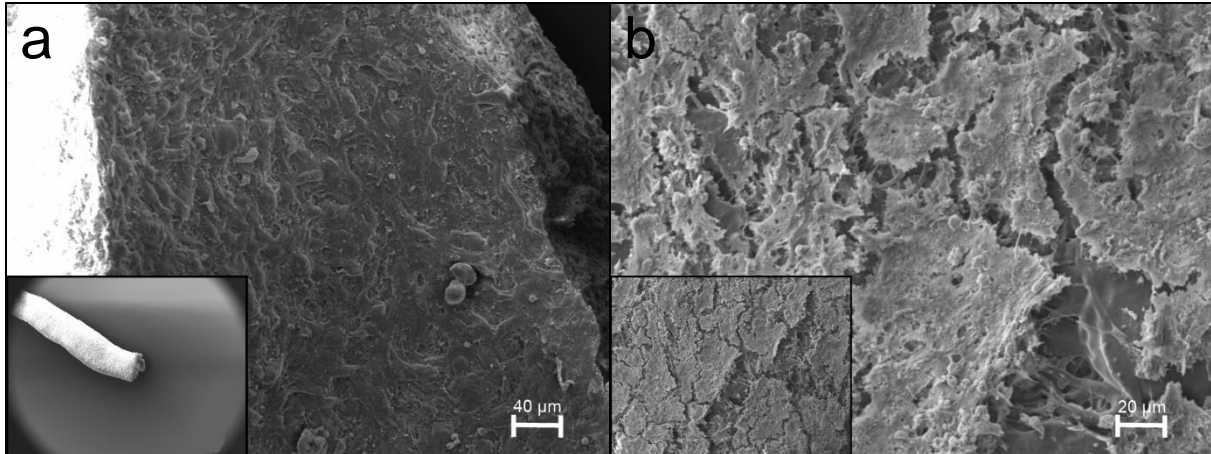


Abbildung 4-18: REM-Aufnahmen von besiedelten PU-Röhren nach dem ersten Versuch mit geringerem Scherstress. Beim Mediumwechsel zur Besiedlung mit EC wurde eine FB-Röhre aus einem der zwei Scaffolds ausgespült (a). Insgesamt war die Besiedlung mangelhaft, da der Zellrasen Lücken aufwies und die Zellen bereits wieder abstarben (b). Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 100-fach (a) bzw. 500-fach (b) (kleines Bild).

In nachfolgenden Untersuchungen wurden somit auch die FB Scherstress ausgesetzt, und die Besiedlung mit EC erfolgte erst nach 48 statt nach 24 h. Die gesamte Versuchsdauer wurde auf 5 d reduziert. Die Perfusion wurde 18 h nach der Besiedlung mit einem Scherstress von 10 dyn/ cm² gestartet, sowohl für die FB, als auch für die EC. Der maximale Scherstress wurde mit 40 dyn/ cm² 1 h vor Ende des Versuchs festgelegt.

Mit diesem Setup wurde eine glatte und kompakte Zellschicht generiert (Abbildung 4-19, a).

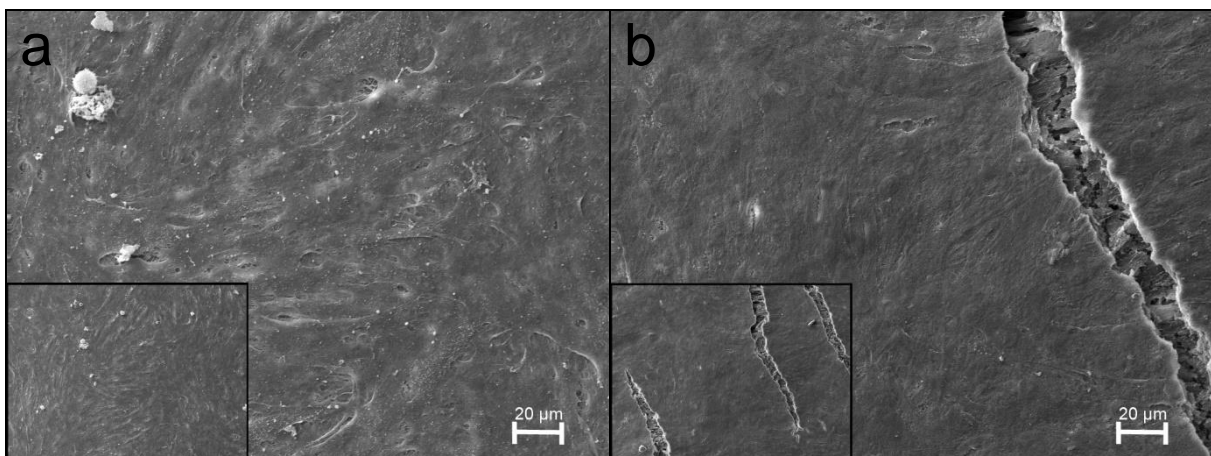


Abbildung 4-19: REM-Aufnahmen besiedelter PU-Röhren nach einem Protokoll, bei dem der maximale Scherstress 40 dyn/ cm² betrug und die Zellen insgesamt für 5 Tage kultiviert wurden. Es fand sich ein glatter und homogener Zellrasen (a, b). Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Teilweise traten Risse im Zellverband auf (Abbildung 4-19, b). Hierbei handelt es sich wieder um durch die Präparation entstandene Artefakte. Die Zellschicht wurde teilweise beim Öffnen

und Auseinanderklappen der Röhre zerrissen. Es ist davon auszugehen, dass die Zellen ohne weiteren Einfluss auf die Röhre einen intakten und vollständigen Zellrasen ausgebildet haben. Durch den etwas erhöhten Fluss (von 30 auf 40 dyn/ cm²) scheinen die Zellen stärker abgeflacht zu sein, als dies beim ersten Versuch der Fall war. Eine Ausrichtung der Zellen in Flussrichtung ist bei diesem Versuchslauf nicht erkennbar.

Im Weiteren wurde angestrebt den Effekt von höherem Scherstress auf die Zellen zu überprüfen. Deshalb wurde der maximale Scherstress auf 70 dyn/ cm² für 1 h erhöht. Außerdem wurde der Scherstress sukzessive (von 10 über 20 auf 40 und schließlich auf 70 dyn/ cm²) erhöht. Das Ergebnis war weniger zufriedenstellend als beim Versuch mit max. 40 dyn/ cm². Die präparationsbedingten Risse traten vermehrt auf, und die Oberfläche war nicht so ebenmäßig wie im vorherigen Versuch. Vereinzelt scheinen Zellen vom Untergrund abgelöst worden zu sein (Abbildung 4-20, b).

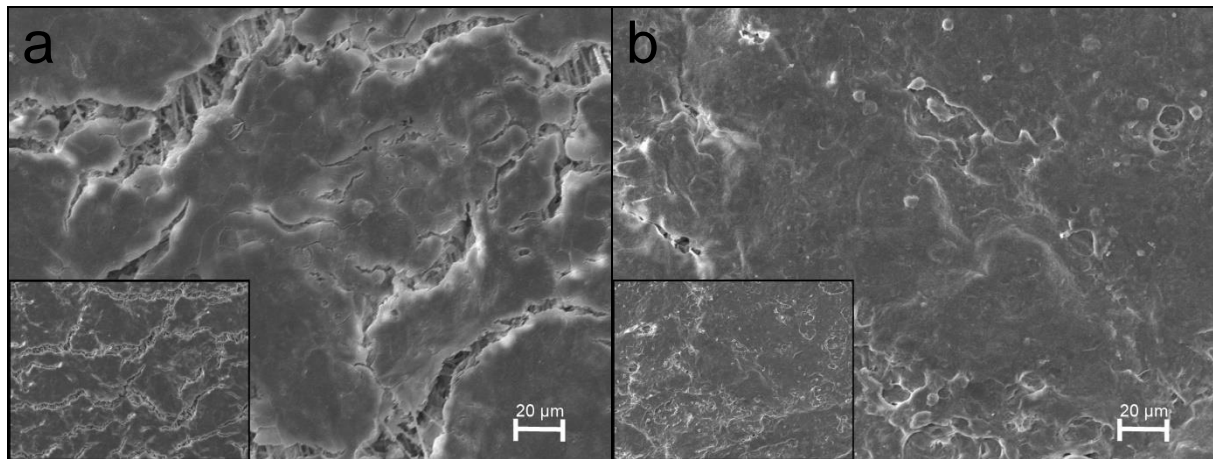


Abbildung 4-20: REM-Aufnahmen von besiedelten PU-Röhren nach einem Protokoll mit einem maximalen Scherstress von 70 dyn/ cm². Dies resultierte in einer weniger stabilen Besiedlung als der vorherige Versuch mit 40 dyn/cm² (Abbildung 4-19). Es bildeten sich vermehrt Risse im Zuge der Präparation (a) und vereinzelt schienen sich Zellen wieder vom Zellverband abzulösen (b). Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Final wurde somit für alle weiteren Versuche das oben genannte Protokoll (Kapitel 3.3.7) festgelegt. Hierbei wurde der Versuchszeitraum nochmals um einen Tag auf 4 d reduziert und es wurde bereits 6 h nach Einsaat der Zellen mit einer moderaten Konditionierung bei 10 dyn/ cm² begonnen.

4.6 Flussversuche mit dem Bioreaktor

4.6.1 Rasterelektronenmikroskopie

Die Besiedlung war auch bei den andern beiden Materialien mit dem für PU etablierten Protokoll erfolgreich. Dennoch zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Scaffolds (Abbildung 4-21).

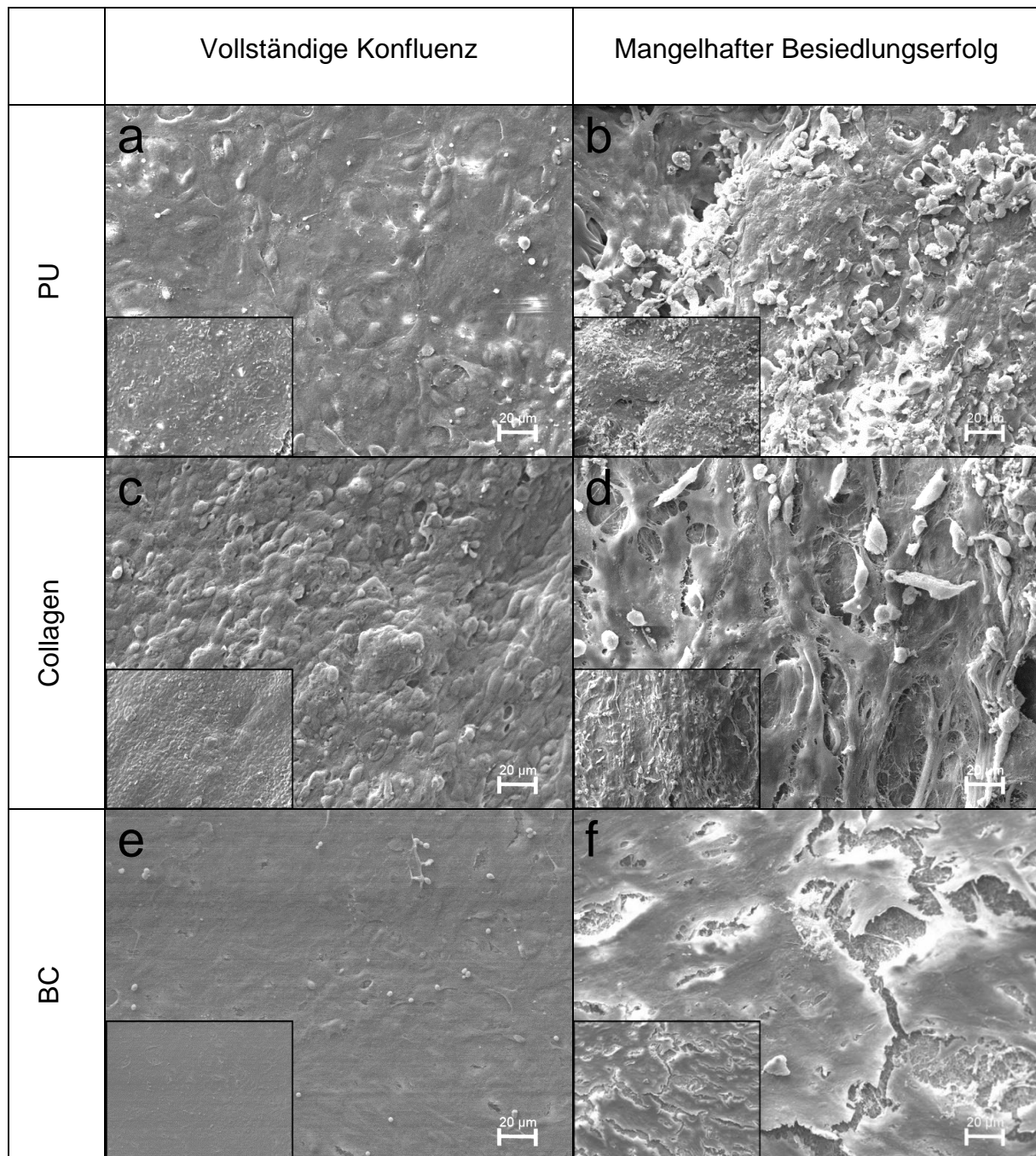


Abbildung 4-21: REM-Aufnahmen von 3 unterschiedlichen Scaffolds (PU = a,b; Collagen = c,d; BC = e,f). Vollständige Konfluenz konnte bei allen Materialien erreicht werden (links). Bei je einem Versuchsdurchlauf ergab sich jedoch nur eine mangelhafte Besiedlung (rechts), was vermutlich auf die Qualität der Zellen zurückzuführen ist. Bei der schlechten Besiedlung stammten diese alle vom gleichen Spender. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).

Bei guter Besiedlung ist ein geschlossener Zellrasen zu sehen und das jeweilige Scaffold ist vollständig von Zellen bedeckt (Abbildung 4-21, links). Die pflastersteinartige Morphologie der Endothelzellen ist bei Collagen am stärksten und bei der BC am geringsten ausgeprägt. Auf der anderen Seite gab es aber auch Versuchsdurchläufe, bei denen kein kompakter Zellrasen durch die Besiedlung im BR generiert wurde (Abbildung 4-21, rechts). Bei der BC erscheint die Zellschicht dünn und ist besonders anfällig für Risse im Verlauf des Trocknungsprozesses bei der Probenvorbereitung für das REM. Bei Collagen und PU ist ebenfalls deutlich eine

Besiedlung erfolgt, doch scheinen die EC nicht adäquat auf den FB zu haften. Vereinzelt ist auch die FB-Zellschicht nicht geschlossen und das darunter liegende Scaffoldmaterial kommt zum Vorschein (Abbildung 4-21, b und d). Alle Läufe mit schlechtem Besiedlungserfolg wurden mit Zellen vom gleichen Spender durchgeführt, so dass die mangelhafte Besiedlung eher auf die Zellen, als auf den Besiedlungsprozess zurückzuführen ist. Auch bei der rt-PCR (vgl. 4.6.3) wurden bei diesem Spender starke Abweichungen gemessen, was diese These stützt.

4.6.2 Immunhistochemie

Bei der Präparation der unter Fluss besiedelten Röhren ist aufgefallen, dass das PU im Präparationsprozess zur Paraffineinbettung „schmilzt“ (Abbildung 4-23). Dies ist bei 80 Schichten starkem PU nicht erkennbar gewesen. Die 20 Schichten hingegen wurden durch das Xylol im Standardprotokoll vollständig aufgelöst. Deshalb durften diese nur wenige Minuten statt mehrere Stunden im Xylol inkubiert werden.

Auch bei Collagen waren nicht alle Präparate gut auszuwerten, da das Material leicht zerstört werden konnte und offenbar durch den Kontakt mit den Zellen noch instabiler wurde (Abbildung 4-24). Die Eigenfärbung der BC stellte kein größeres Problem dar, da sich das Material eindeutig von gefärbten Zellen unterscheiden ließ (Abbildung 4-25).

Die im Folgenden gezeigten Präparate sind besonders gut besiedelte Exemplare. Insbesondere bei Collagen war eine gute Besiedlung aber die Ausnahme. Außerdem lagen bei Collagen und PU häufig starke Multilayer von FB vor (Abbildung 4-23 und Abbildung 4-24, TE7). Um einen Vergleich zum derzeit verwendeten Goldstandard ziehen zu können, wurden auch native Venen immunhistochemisch untersucht.

Die native Vene weist positive Markierungen für TE7 auf, insbesondere an der Gefäßwand, aber auch im Inneren der Vene (Abbildung 4-22).

Bei PU ist auffällig, dass die durch TE7 indizierte FB-Schicht sehr ausgeprägt und mehrschichtig ist. Eine Markierung für TE7 ist auch auf Collagen vorhanden, der Zellrasen ist aber nicht vollständig geschlossen. Auf BC ist bei mehreren Präparaten ein geschlossener FB-Monolayer zu erkennen.

Die CD31-Markierung beschränkt sich bei der nativen Vene auf die luminale Zellschicht, wobei Lücken im Zellrasen erkennbar sind.

Auf PU sind die EC als starker mehrschichtiger Zellrasen erkennbar. Eine vollständige Besiedlung scheint stattgefunden zu haben. Auch bei Collagen ist eine geschlossene Zellschicht mit positiven Markierungen für CD31 erkennbar. Wie sich an diesem Bild aber zeigt, und wie es häufig bei Collagen vorgekommen ist, hat sich der gesamte Zellrasen aus FB und EC vom Collagen gelöst und scheint nicht stabil am Collagen angehaftet zu sein. Die EC-Schicht auf BC ist stark abgeflacht, allerdings nicht zur Gänze geschlossen.

ICAM ist in der nativen Vene vermehrt auf der luminalen Seite zu finden, ebenso wie an kleinen Venolen in der Gefäßwand.

Die auf PU angesiedelten Zellen weisen massive positive Markierungen für ICAM, sowohl in der FB- als auch in der EC-Schicht auf. Die Zellen auf Collagen sind deutlich schwächer markiert und auf BC sind positive Markierungen auf die Außenseite der EC beschränkt.

Die Markierung mit VE-Cad taucht bei der nativen Vene sowie auf BC nur sehr vereinzelt auf und ist in den Zellen auf PU und Collagen gar nicht zu finden.

Auch SMC-Myosin ist nur in den Proben der nativen Vene zu detektieren, hier insbesondere in den tieferen Schichten, während in den auf den verschiedenen Materialien adhärierten Zellen keine positive Markierung von SMC-Myosin vorliegt.

FN (Fibronektin), Collagen IV und ASMA sind sowohl mit der in Großhadern etablierten Methode mit Paraffinmaterial durchgeführt worden (Kapitel 3.4.1.3), als auch mit Kryo-Material nach der Methode am Institut für Pathologie (Medizinische Fakultät der Friedrich-Schiller Universität Jena) in Jena (Kapitel 3.4.1.5). Dies war für die Materialien Collagen und BC sowie für die native Vene möglich, das PU hingegen splitterte stets beim Versuch es nach dem Einfrieren zu schneiden und konnte somit nur mit der Paraffin-Methode untersucht werden. Die Ergebnisse der beiden Methoden sind vergleichbar und werden im Folgenden dargestellt.

FN ist in der nativen Vene im Bindegewebe, als auch in den EC zu detektieren.

Bei PU erscheint die Lokalisation diffus sowohl in den EC, als auch in den FB zu sein, allerdings nicht ubiquitär. Die Zellen auf Collagen weisen eine massive und vollständige Expression von FN, sowohl im Paraffin- als auch im Kryomaterial auf. Auf BC zeigen die Zellen eine Markierung für FN an der Grenzfläche zum Material, sowie an der Zellwand der EC (Paraffin). Beim Kryomaterial ist die Markierung auf die Zellwand/ Zellkontakte zwischen den EC beschränkt.

Die native Vene weist Collagen IV in den EC in Richtung Lumen sowie in den kleinen Venolen auf, als auch in den tiefer gelegenen Schichten.

Die Zellen auf PU sind gänzlich negativ für Collagen IV, wohingegen die Zellen auf Collagen eine moderate Positivfärbung zeigen. Dies ist im Kryomaterial nochmals deutlicher zu erkennen. Bei BC ist die starke Färbung an der Grenzfläche zum Material auffällig und eine moderate Färbung zwischen den EC erkennbar.

ASMA kommt in der nativen Vene in der EC-Schicht vor, scheint aber auch schwach in den tiefer liegenden Schichten exprimiert zu sein.

Auf PU zeigt sich die Expression (nur im Paraffinmaterial) hingegen nur sehr vereinzelt, die markierte Zelle befindet sich in der EC-Schicht. Auf Collagen und BC sind die FB positiv markiert und darüber hinaus sind in tieferen Schichten der BC vereinzelt positive Markierungen zu finden. Insbesondere beim Kryomaterial ist ASMA auf Collagen deutlich stärker exprimiert als in der nativen Vene während die Expression in Zellen auf BC moderater ist.

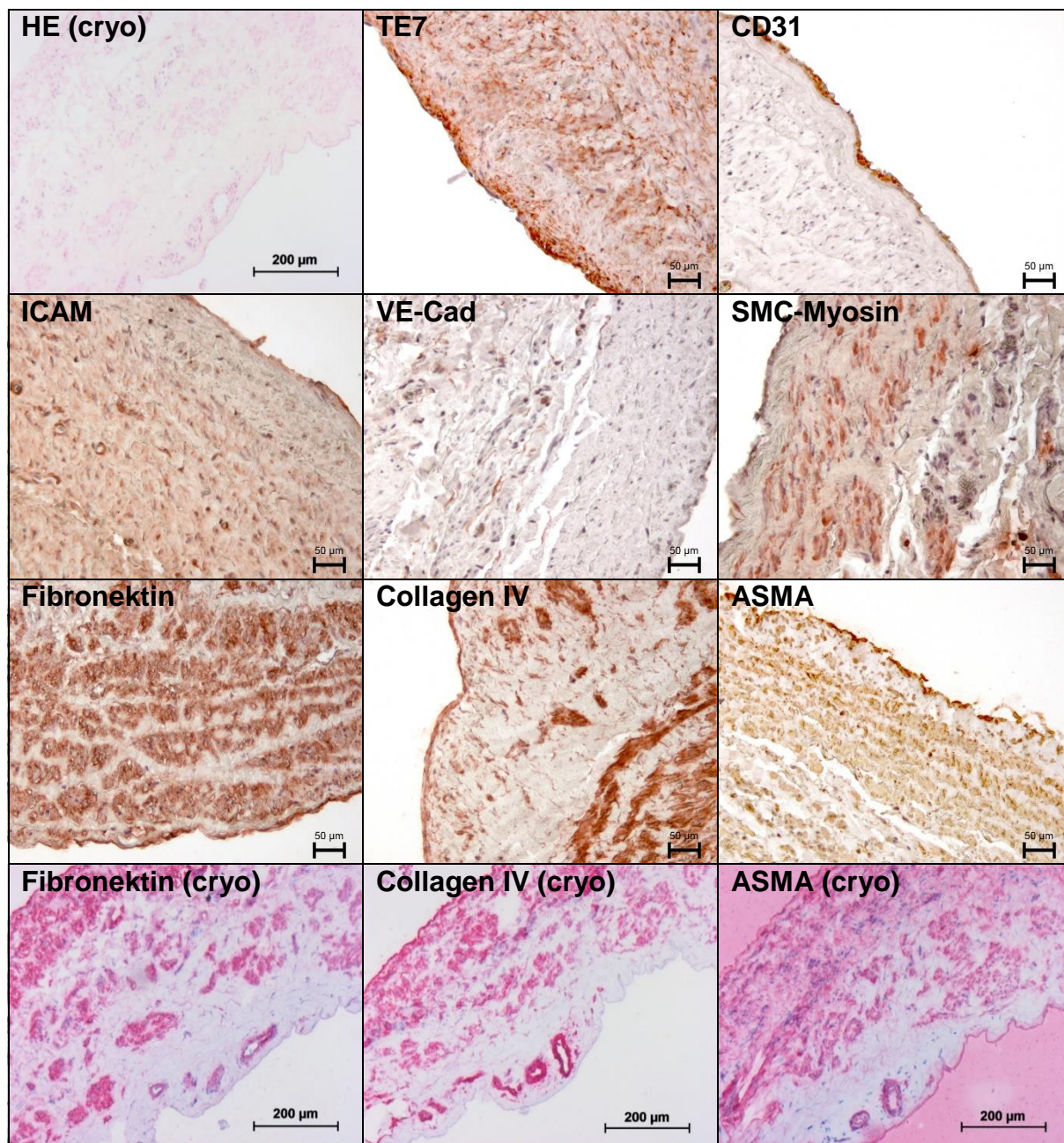


Abbildung 4-22: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von nativem Venenmaterial

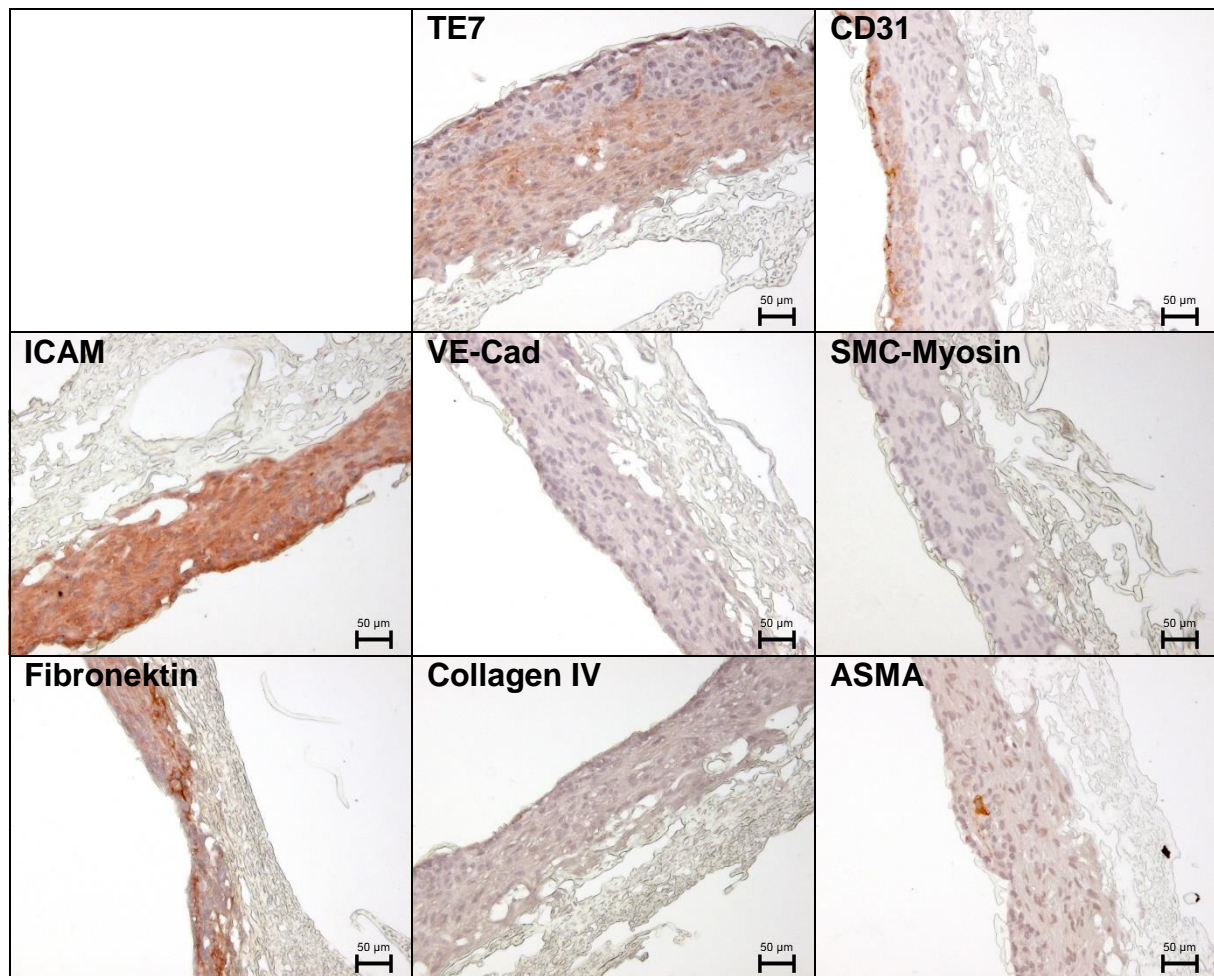


Abbildung 4-23: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten PU- Röhren

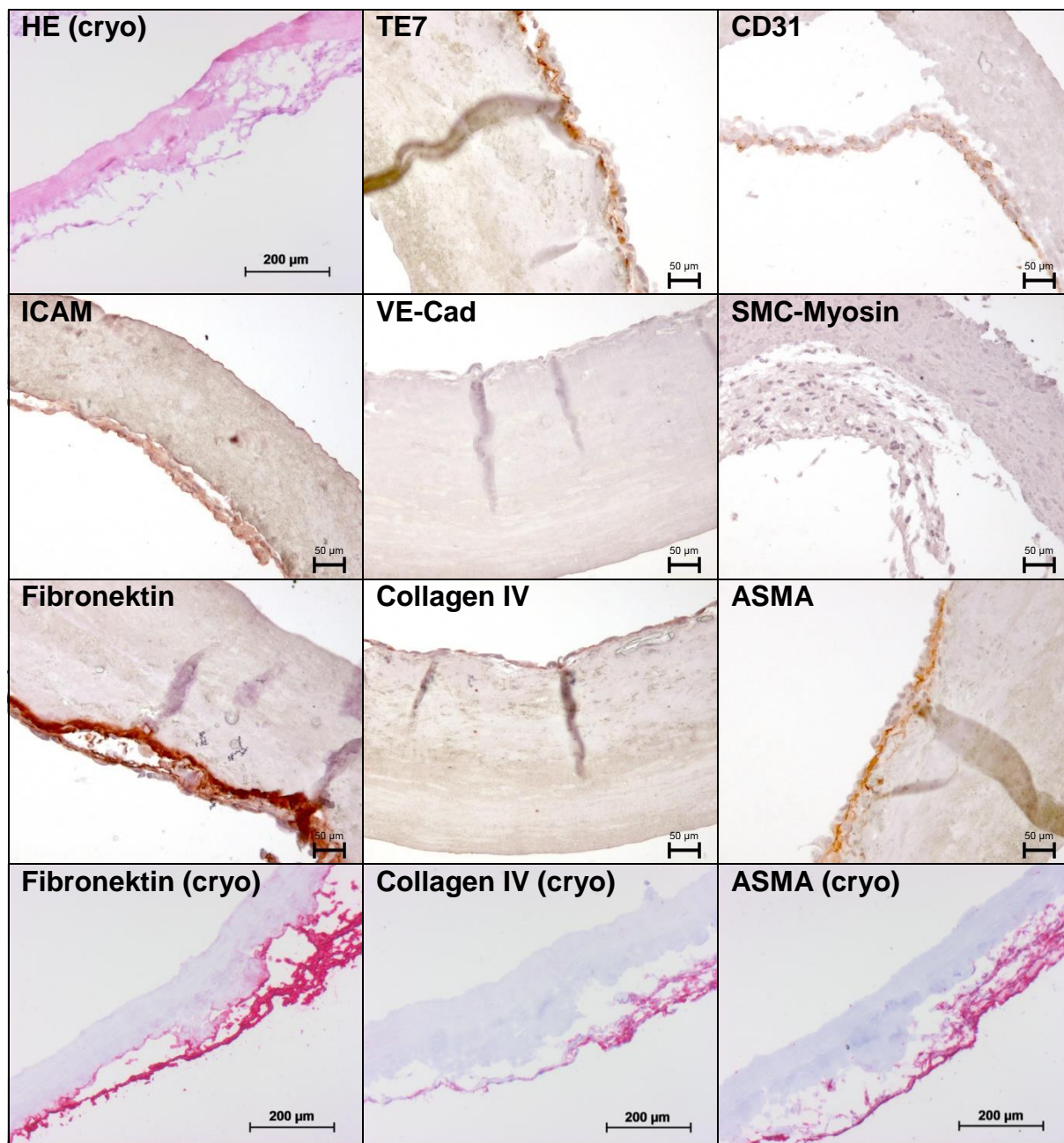


Abbildung 4-24: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten Collagenröhren

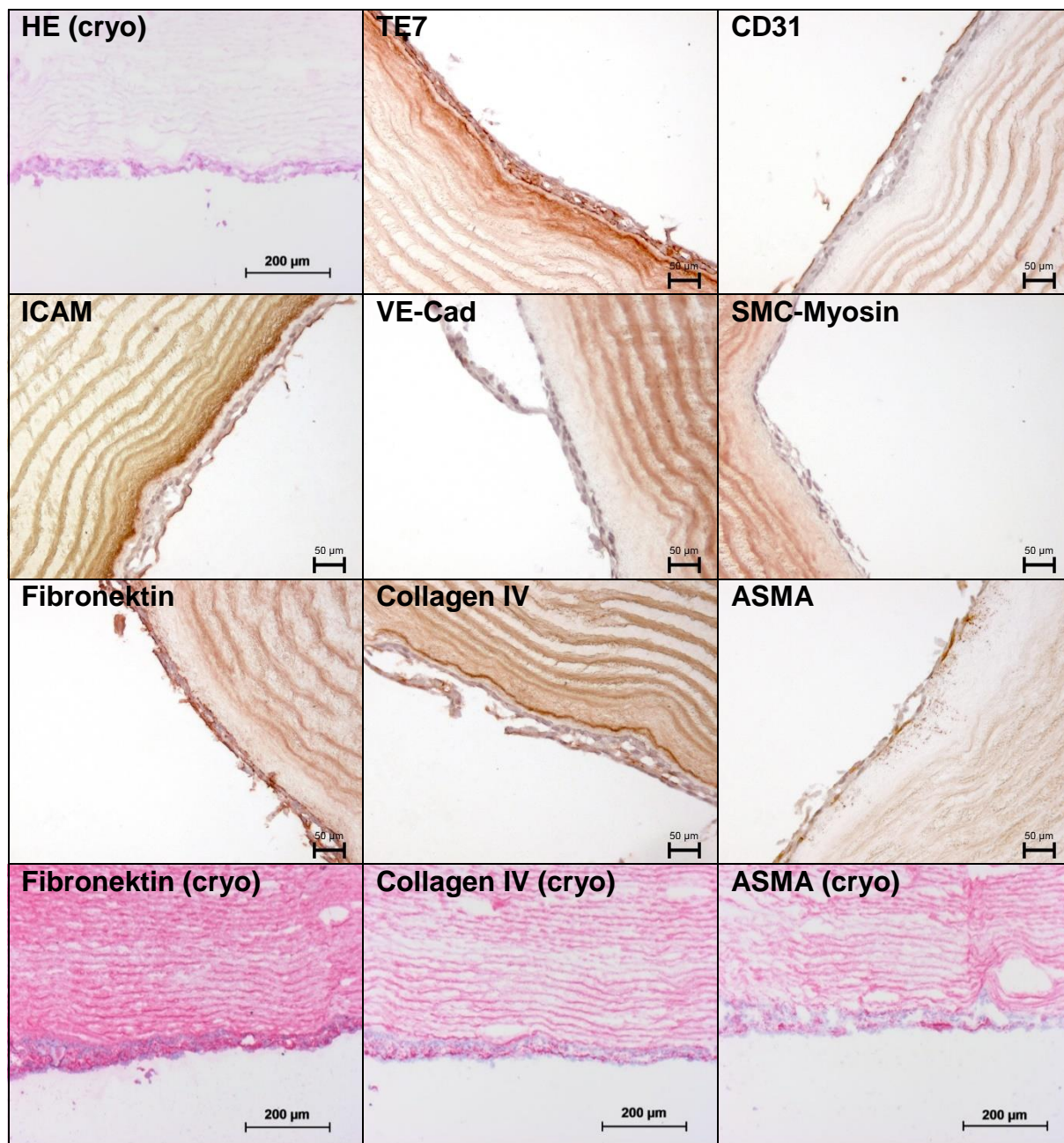


Abbildung 4-25: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten Röhren aus bakterieller Cellulose.

4.6.3 RNA-Expressionsuntersuchung

Die Isolation der RNA nach dem Standardprotokoll führte bei den PU- und Collagen-Proben zu einer guten Ausbeute, während bei bakterieller Cellulose die Ausbeute mangelhaft war (Abbildung 4-26). Durch eine RNA-Menge von nur 18 ng/ μ l war diese zur Untersuchung nicht geeignet.

Als Referenz zu den Proben aus den Besiedlungsversuchen wurden in T75-Zellkulturflaschen kokultivierte Zellen der gleichen Spender verwendet. Hierfür wurden wie bei der Besiedlung der Scaffolds zunächst FB und nach 2 Tagen EC ausgesät. Die Isolation von RNA aus nativen Venenstücken lieferte aufgrund einer zu langen Lagerung der Proben nach der Entnahme vom Patienten nur eine Ausbeute von 5,5 ng/ μ l, so dass auch diese nicht für vergleichende Untersuchungen herangezogen werden konnte.

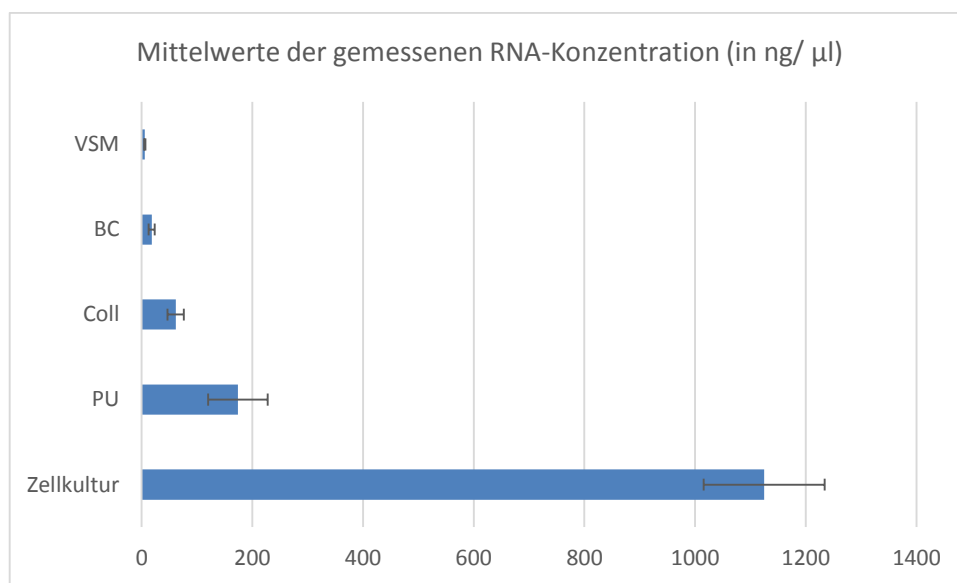


Abbildung 4-26: Mittelwerte der gemessenen RNA-Konzentration in ng/ μ l für die Isolation der RNA aus nativem Venenmaterial (VSM), Zellen isoliert nach Besiedlung und Konditionierung im Bioreaktor auf den 3 verschiedenen Scaffolds sowie Zellen aus der Zellkultur (Kokultur von FB und EC). Auf bakterieller Cellulose und im nativen Material war der RNA-Gehalt so gering, dass eine Untersuchung der Proben mittels rt-PCR nicht möglich war.

Für die Auswertung der Proben wurde sich der $\Delta\Delta C_t$ -Methode (Kapitel 3.4.3.3) bedient. Hierbei gilt, dass alle Gene, welche einen Wert geringer als 1 aufweisen, im Vergleich zur Zellkultur herunter reguliert sind, während alle Gene mit Werten höher als 1, hochreguliert sind.

IL-6 (PU = 0,53, Koll = 0,21) sowie VCAM (PU = 0,31, Koll = 0,41) sind in beiden Proben um die Hälfte bis um das 4-fache gegenüber der Zellkultur herunter reguliert. Demgegenüber ist IL-8 schwach in auf Collagen kultivierten Zellen (1,14) und stärker in Zellen auf PU (1,79) hochreguliert. Der Marker MCP-1 ist in auf PU kultivierten Zellen schwach hochreguliert (1,33) während er in Zellen auf Collagen schwach herunterreguliert ist (0,84). Die deutlichsten Unterschiede stellten sich bei IL-1 α dar. Während die Zellen auf PU nur noch knapp die Hälfte

des Markers exprimierten (0,53), war IL-1 α in auf Collagen kultivierten Zellen um das 6-fache gegenüber der Zellkultur erhöht (5,96).

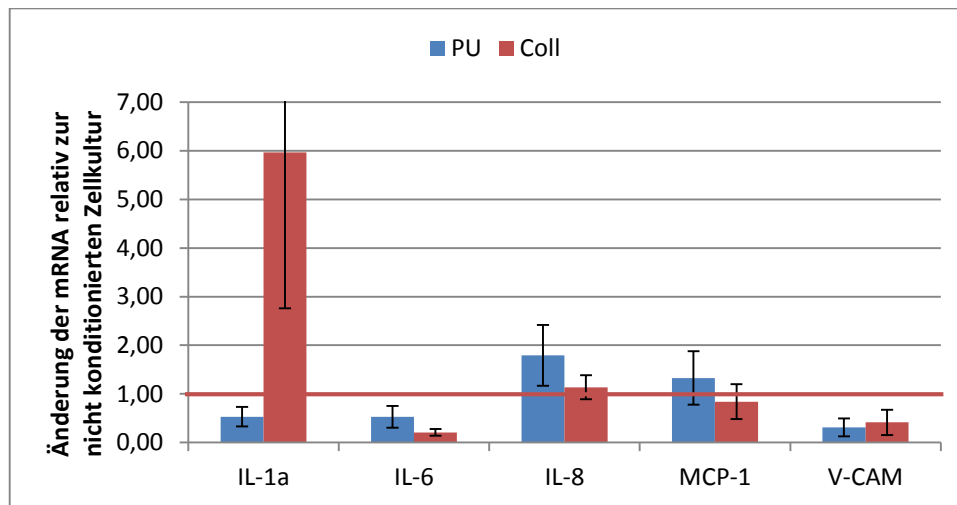


Abbildung 4-27: Änderung des relativen mRNA-Gehalts der gemeinsam kultivierten FB und EC nach Besiedlung und Konditionierung auf PU bzw. Collagen im BR im Vergleich zu statisch kultivierten FB und EC in Zellkulturflaschen. Letztere weisen bei dieser Auswertungsmethode stets den Referenzwert 1 auf (rote Linie).

4.7 Zusammenfassung

Wie in Tabelle 4-1 dargestellt variieren die Materialien in Bezug auf Besiedelbarkeit, durchführbare Untersuchungsmethoden, Stabilität und Zellreaktion. Mit PU und BC wurden hierbei die besten Ergebnisse erzielt.

Tabelle 4-1: Zusammenfassung des Besiedlungserfolges der verschiedenen Materialien.

+ = erfolgreich, (+) = eingeschränkt, - = mangelhaft, n.t. = nicht getestet

		PU	Collagen	Dezell. Venen	BC
Besiedlung	von Patches	n.t.	+	n.t.	+
	im BR mit Rotation	+	+	-	+
	im BR mit Perfusion	+	+	n.t.	+
Untersuchungs- methoden	REM	+	+	+	+
	IHC (Paraffin)	(+)	+	+	+
	IHC (kryo)	-	+	+	+
	RT-PCR	+	+	n.t.	-
Stabilität des Materials		+	-	+	+
Stabilität der Zellschicht		+	(+)	-	+
Zellreaktion auf die Materialien		+	-	n.t.	+

5 Diskussion

Die steigende Lebenserwartung unserer Bevölkerung und die damit verbundene Steigerung von altersbedingten Gefäßleiden macht die Suche nach leicht verfügbaren Gefäßersatz mit ausreichender Lebensdauer erforderlich. Das BR-gestützte TE liefert eine geeignete Plattform für dieses Vorhaben. Hierbei sollen Gerüstmaterialien in Form des Transplantates mit geeigneten Zellen besiedelt, konditioniert und dem erkrankten Patienten eingesetzt werden. Durch gesundheitspolitische Reglementierungen ist das Augenmerk auch auf die Kosteneffizienz des Verfahrens zu richten. Mit der Entwicklung eines entsprechenden BR-Prototyps in unserer Arbeitsgruppe [77] wurde ein entscheidender Schritt in diese Richtung getan.

Aufgrund geringer ethischer Bedenken, guter Verfügbarkeit und einem etablierten Protokoll zur Zellgewinnung wurden Endothelzellen und Fibroblasten der *Vena saphena magna* zur Testung des BR-Prototyps und zur Entwicklung des Besiedlungsprozesses verschiedener Scaffoldmaterialien genutzt. Reststücke von Gefäße konnten mit Zustimmung der Patienten, im Rahmen einer Bypassoperation gewonnen und anschließend die Zellisolation vorgenommen werden.

Die eingesetzten Scaffoldmaterialien sollten ein möglichst breites Spektrum an Materialeigenschaften und Materialherkunft abdecken um die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten des Bioreaktors zu belegen. Die verschiedenen Materialien und ihr Besiedlungserfolg wird näher in Kapitel 5.3 diskutiert.

Als problematisch stellte sich im Laufe der Arbeit heraus, dass das Protokoll zur Dezellularisierung der nativen Venen aus patentrechtlichen Gründen nicht näher bekannt war. Dies machte eine detaillierte Fehlersuche nach mangelhaften Besiedlungserfolg nahezu unmöglich.

5.1 Prozessentwicklung zur Verwendung des Bioreaktors

Der BR wies zu Beginn der hier vorliegenden Arbeit verschiedene Fehler auf, welche nach und nach behoben werden konnten. Zunächst mussten Schläuche und Anschlüsse zur Verbindung der einzelnen BR-Komponenten ausgewählt werden, da die ursprünglich angedachte Verbindung mit Kabelbindern zu Leckagen führte und in der Handhabung umständlich war. Ebenso mussten die Adapter zur Befestigung der Scaffolds am Scaffoldhalter ausgetauscht werden um eine ausreichend große Besiedlungsfläche zu erreichen. Die Bohrungen im Deckel, welche die Längenverstellbarkeit des Besiedlungszylinders ermöglichten, erwiesen sich als weitere Schwachstelle für die Dichtigkeit des BR. Deshalb wurden die Bohrungen zuverlässig mit Teflonband abgedichtet was allerdings auf Kosten der Längenverstellbarkeit ging. Diese war nur noch mit vermehrtem Aufwand umzusetzen, so dass im Rahmen der

vorliegenden Arbeit gänzlich darauf verzichtet wurde. Mehrfach stoppte die Rotation des Besiedlungszyinders auf dem Mixer. Durch die feuchte Umgebung im Brutschrank wurde der Reibungswiderstand zu gering und die rotierende Walze entwickelte keine ausreichende Kraft um den Zylinder in Bewegung zu setzen. Da zunächst die verkalkten Nadellager der hinteren, nicht aktiv betriebenen Walze für das Blockieren verantwortlich gemacht wurden, wurden geschlossene Kugellager eingesetzt. Da diese Maßnahme das Problem nicht behob wurde der Mixer mit einem weiteren Keilriemenantrieb ergänzt, woraufhin die Rotation gewährleistet werden konnte.

Nach diesen Maßnahmen konnte der BR zuverlässig für die Etablierung des Besiedlungs- und Konditionierungsprogramms verwendet werden.

Zunächst wurden erste Versuche mit PU unternommen und die Röhren mit $7,5 \times 10^5$ Zellen pro cm^2 besiedelt. Diese Zellzahl geht auf die Besiedlung von Herzklappen in unserem Labor zurück [85] und erwies sich auch bei den Röhren als zielführend. Auch Ott und Ballermann hatten bereits 1995 diese Zellzahl zur Besiedlung von PU-Röhren verwendet [84]. Bei Gulbins *et al.* kamen ähnliche Zellzahlen (zwischen $5,7 \times 10^5$ und $1 \times 10^6 / \text{cm}^2$) zum Einsatz [28].

Bei der Besiedlung und Konditionierung der TEVG im BR mit Scherstress stellte sich schnell heraus, dass sich der Zellrasen bei initial minimal einstellbaren $100 \text{ dyn} / \text{cm}^2$ vom Scaffold löste und keine zuverlässige Besiedlung möglich war. Tatsächlich hat auch die Recherche in der Literatur bei der Herstellung von TEVGs deutlich geringere dyn-Werte angezeigt [37], [83], [84]. Darüber hinaus geben Yamamoto und Ando lediglich Scherkräfte von $20 \text{ dyn} / \text{cm}^2$ für arterielle Gefäße und von $1,5$ bis $6 \text{ dyn} / \text{cm}^2$ für venöse Gefäße an [86]. Dieser Umstand wurde scheinbar bei der Entwicklung des BR-Prototyps nicht hinreichend betrachtet.

Die für die Besiedlung erforderlichen Perfusionsbedingungen von 10 bis $40 \text{ dyn} / \text{cm}^2$, was je nach Durchmesser der Gefäße zwischen $0,35$ und $5 \text{ ml} / \text{min}$ entspricht, erforderten eine Pumpe mit geringerer Pumpleistung als die verwendete von Welco Co. Ltd. Für eine kostengünstige und schnelle Umsetzung wurde im Rahmen dieser Arbeit auf einen Infusomat zurückgegriffen, welcher den erforderlichen Scherstress erzeugen konnte und in der Klinik Verwendung findet. Diese Pumpe musste jedoch außerhalb des Brutschrankes betrieben werden, so dass der ursprüngliche Vorteil des BR - der Betrieb komplett in der standardisierten Umgebung eines Brutschranks - wieder aufgehoben wurde. Deshalb sollte für zukünftige Versuche eine entsprechende Pumpe implementiert werden. Von den von Anja Friedrich in unserer Arbeitsgruppe in Erwägung gezogenen Pumpen [77] erfüllen beispielsweise die Pumpen des Typs MCP-E 360 von IDEX Health & Science GmbH mit $72 \mu\text{l}$ bis $880 \text{ ml} / \text{min}$ oder die Pumpen von Williamson Manufacturing Co. Ltd. aus der 200er Serie mit $10 \mu\text{l}$ bis $412 \text{ ml} / \text{min}$ die geforderten Bedingungen.

5.2 Potential des „all-in-one“-BR für die kommerzielle Herstellung von TEVG

Während Bioreaktoren beispielsweise von Hoenicka *et al.*, Lyons und Pandit oder Massai *et al.* über einen komplexen Aufbau zur permanenten Beobachtung verschiedener Parameter wie Druck, pH-Wert, Gas und Temperatur verfügen [87]–[89] oder wie bei Gurjarpadhye *et al.* die Besiedlung mikroskopisch und nicht-invasiv mitverfolgt werden kann [90], zeichnet sich unser hier präsentierter BR durch seine Handlichkeit und die einfache Implementierung in ein gängiges Zellkulturlabor aus. Es sind lediglich eine Sterilbank für den sterilen Zusammenbau, ein Brutschrank zur Schaffung standardisierter Umgebungsparameter und eine Einrichtung zur Gassterilisation notwendig. Darüber hinaus sind viele der überprüften Parameter durch die Verwendung im Brutschrank bereits vorgegeben, so dass auf eine umfangreiche Sensorik verzichtet werden kann. Mit Herstellungskosten von gerade 400 € ist der BR für Forschungslabore ein attraktives Tool um unter anderem schnelle Materialtestungen oder pharmakologische Tests mit Endpunktbestimmung durchzuführen. Dank seiner Robustheit ist der Einsatz des BR im Rahmen von Langzeitexperimenten denkbar.

Des Weiteren bietet der BR für den Transfer des kardialen TE von der Forschung in die kommerzielle Anwendung einen vielversprechenden Ansatz. Die meisten bisherigen Protokolle zur Entwicklung von TEVG scheitern durch enorme Herstellungskosten und aufwändige Prozedere an einer Umsetzung im Klinikalltag [20], [22], [91]. Mit einem zum Großteil automatisierten Herstellungsprozess von TEVG sinken Kosten, Risiken der Kontamination sowie benutzerabhängige Schwankungen bei der Generierung der TEVG [66], [68], [92].

Wie bei Fermentern, in welchen auf Basis von pro- oder eukaryotischen Zellen große Mengen an rekombinanten Proteinen, Impfstoffen, Genen oder Viren produziert werden, wäre eine Entwicklung hin zum Einweg-BR [93], [94] wünschenswert. Hierbei würde das gesamte Material, welches mit Zellen und Medium in Kontakt ist, als Einwegmaterial hergestellt werden, so dass aufwändige Reinigungsschritte des BR entfallen und eine Gefährdung des Patienten durch potentielle Kontaminationen sowie der Arbeitsaufwand zur Fertigung des TEVG minimiert werden können. Steuerungseinheit, Mixer, Pulser und Pumpe können aber immer wieder verwendet werden. Für die Herstellung von TEHV (engl.: *tissue engineered heart valves*) wurde bereits im vergangenen Jahr von Converse *et al.* ein Prototyp eines Einweg-BR vorgestellt [95] und damit auf die heutigen Erfordernisse eingegangen.

Unser Ziel sollte die Integration des BR in eine Zellkultivierungs- und Besiedlungsstraße sein, um eine vollautomatisierte Herstellung von TEVG zu realisieren. Durch die verschiedenen Anschlüsse zur Applikation der Zellen, Mediumwechsel und Belüftung ist dies mit dem BR potentiell möglich.

5.3 Besiedlungserfolg und Eigenschaften der einzelnen Scaffoldmaterialien

Bis auf die dezellularisierten Venen waren sämtliche Scaffoldmaterialien mit dem BR zu besiedeln. Auch zeigte das Protokoll zur Besiedlung mit anfänglicher Rotation und späterer Perfusion mit bis zu 40 dyn/ cm² eine verbesserte Zellmorphologie und Besiedlungseffizienz. Dies scheint den Aussagen von Arrigoni *et al.* entgegen zu laufen, die beobachtet haben, dass die Rotation bei der Besiedlung von Gefäßen mit porcinen SMC bessere Ergebnisse erzielt als die Perfusion [69]. In der vorliegenden Arbeit führte die Besiedlung nur mit Rotation zu verstärkten Multilayern an vereinzelt Stellen und teilweise komplett zellfreien Stellen im Scaffold. Nach zusätzlicher Perfusion und Pulsation war die Zellschicht gleichmäßiger, und die Zellen waren deutlich in Flussrichtung abgeflacht. Die Unterschiede der Besiedlungseffizienz und Zellmorphologie sind möglicherweise auf unterschiedlichen Zellen und Scaffoldmaterialien zurückzuführen. Zudem lag der von Arrigoni verwendete Scherstress lediglich bei 1 dyn/ cm², während in der hier vorliegenden Studie Scherkräfte zwischen 10 und 40 dyn/ cm² gewirkt haben. Dennoch kann für zukünftige Experimente mit unserem hier vorgestellten BR in Betracht gezogen werden, die Rotation während des gesamten Besiedlungszeitraums fortzuführen und nicht wie bisher nach 6 Stunden gänzlich zu stoppen. Trotz der prinzipiell guten Besiedelbarkeit von PU, Collagen und BC zeigten sich Unterschiede in der Expression verschiedener Marker wie ASMA, FN, Collagen IV, Interleukinen und TNF α . Auch sind die den Möglichkeiten zur Auswertung der Materialien verschieden. TEVG aus PU waren im kryokonservierten Zustand nicht mit dem Kryotom zu schneiden, was eine IHC unmöglich machte. Zur Einbettung des PU in Paraffin musste das Routineprotokoll zur Paraffineinbettung des Zentrums für Neuropathologie und Prionenforschung am Klinikum der Universität München angepasst werden. RNA konnte nicht in ausreichender Menge von Zellen auf BC gewonnen werden. Darüber hinaus waren das Handling und die Haltbarkeit der Materialien unterschiedlich.

PU erwies sich als zuverlässig zu besiedelndes Material. Dennoch deuten die ausgeprägten Multilayer von FB und EC auf den hier besiedelten PU-Röhren eine mögliche Limitation zur Verwendung als Bypassmaterial an, auch wenn Jeschke *et al.* gezeigt hatten, dass PU gegenüber ePTFE eine geringere Neigung zur Hyperplasie aufweist. Bei einer vergleichenden Untersuchung wurden Röhren aus PU beziehungsweise aus PTFE in die Bauchorta von Ratten implantiert und nach festgelegten Zeiträumen wieder explantiert und untersucht. Dabei wiesen die PU-Grafts eine schnellere luminale Endothelialisierung, geringere chronische intimale Proliferation und eine deutlich dünnere Neointima im Gegensatz zu den PTFE-Röhren auf [96].

Auf Collagen war hingegen die Besiedlung weder vollständig, noch war das Material aufgrund mangelhafter Nahtfestigkeit stabil genug um potentiell einem Patienten eingesetzt zu werden. Auch hier war mehrfach die Bildung von Multilayern zu beobachten. Das Problem der geringen

Stabilität wurde bereits von Weinberg und Bell aufgezeigt und durch Kombination des Collagens mit Dacron umgangen [17].

Die Befestigung von PU und Collagen mittels Festknoten der Scaffolds mit chirurgischem Faden führte zu einem Größenunterschied im Innendurchmesser der Gefäße und des deutlich kleineren Adapters (compliance mismatch). Ein compliance mismatch wird von Trubel *et al.* als mögliche Ursache von Hyperplasie nach Bypassoperationen angesehen [97] und könnte auch bei der vorliegenden Arbeit zu dem verstärkten Auftreten von Multilayern beigetragen haben.

Bei BC zeigte sich, dass die Zellen auf dem Material bevorzugt als Monolayer wuchsen. Hier waren der Innendurchmesser der BC-Röhren und der Durchmesser des Adapters annähernd gleich.

SMC-Myosin ist ein wichtiger Marker für glatte Muskelzellen [98]. Dass keine Markierung für das Protein in den Zellen der Scaffolds detektiert werden konnten belegt, dass die Zellen nicht durch glatte Muskelzellen kontaminiert waren. Auch ASMA ist ein Protein, welches in glatten Muskelzellen auftritt [98] aber ebenso in kontraktile [99] und aktivierten FB [100]. Diese konnten in der eigenen Untersuchung deutlich beim Kontakt mit Collagen und in geringem Maße bei Kultivierung auf BC nachgewiesen werden.

Aktivierte FB zeichnen sich durch eine hohe kollagenolytische Aktivität aus, was die Instabilität des besiedelten Collagens erklären kann. Im Gegensatz dazu ist die Aktivierung der Zellen auf PU und insbesondere auf BC deutlich geringer.

Ebenso wie ASMA in FB deutet FN in EC auf einen aktivierten Phänotyp hin [101] und ist wiederum in Zellen auf Collagen besonders stark exprimiert. Ob dieses morphologische Bild funktionell eine reine Destruktion widerspiegelt oder ob es sich hierbei im Idealfall um ein spezifisches organotypisches Matrixremodelling handelt sollte Thema weiterführender Untersuchungen sein.

Grundsätzlich scheinen die Zellen auf Collagen die stärkste Aktivierung zu erfahren, während diese auf PU moderater ist, im Vergleich zur nativen Vene aber immer noch erhöht. Laut Yang *et al.* führt die Kultivierung von Zellen auf BC des Herstellers Xellutec zu einem ruhenden Phänotyp [102], was eine Erklärung für die geringe Aktivierung und die Ausbildung von Mono- statt Multilayern liefern könnte.

Interessant ist schließlich, dass Collagen IV, ein Protein, das laut Pöschl *et al.* für die Aufrechterhaltung der Funktion der Basalmembran unter steigenden mechanischen Ansprüchen essentiell ist [103] an der Grenzfläche zwischen BC und FB sehr stark exprimiert ist, während es auf Collagen schwächer und auf PU nicht vorhanden ist.

Zusammenfassend zeigen die immunhistochemischen Untersuchungen der besiedelten und konditionierten Scaffolds, dass eine Zellantwort abhängig vom Trägermaterial ist. Collagen fördert am deutlichsten die Aktivierung der Zellen mit dem Ergebnis einer Lyse des Scaffolds.

PU und BC scheinen inerte zu sein, was sich positiv auf die Formierung einer geschlossenen luminalen Zellschicht auswirkt. Eine Destruktion des Trägermaterials ist nicht nachweisbar.

Eine Besiedlung des Trägermaterials im Sinne eines physiologischen Wandaufbaues ist unter den gegebenen experimentellen Bedingungen nicht zu verzeichnen, so dass die Stabilität des Grafts primär von den physikalischen Eigenschaften des Trägermaterials bestimmt wird.

Da Mattace-Raso *et al.* und Cohn den Grad der Starrheit arterieller Gefäße mit einem erhöhten Risiko für kardiovaskuläre Ereignisse assoziieren [104], [105], ist es möglich, dass die weichere und flexiblere BC dem recht starrem PU überlegen ist.

Postlethwaite *et al.* zeigten bereits 1988, dass eine Inkubation von FB mit 27,5 pg/ ml IL-1 α für 24 h unter anderem zu einer 8-fach erhöhten Synthese von Collagenasen und zum Wachstum und zur Proliferation von FB führt [106]. Die Destruktion des Collagen-Scaffolds im Rahmen der Besiedlung in dieser Arbeit ist somit mit der erhöhten IL-1 α -Expression zu erklären, welche bei der RNA-Untersuchung gezeigt wurde. Die starke Aktivierung der Zellen, wie sie auf Collagen erfolgte, blieb hingegen auf PU aus.

Gegenüber der verzeichneten Unterschiede in der IL-1 α -Expression sank die Expression des proinflammatorischen Markers IL-6 sowohl bei konditionierten Zellen auf PU als auch in noch stärkerem Maße auf Collagen. Dies entspricht früheren Ergebnissen aus unserer Arbeitsgruppe, bei denen Thierfelder nachgewiesen hatte, dass IL-6 bei der Kokultivierung und Konditionierung von FB und EC auf PU-Herzklappen gegenüber unkonditionierten FB deutlich reduziert war [48].

IL-8, was in EC an der Angiogenese beteiligt ist [107] wird durch Scherstress in seiner Expression angeregt [108], [109]. Diese Beobachtung konnte auch im Rahmen dieser Untersuchung insbesondere für Zellen auf PU gemacht werden, während der Effekt in Zellen auf Collagen nur sehr schwach ausgeprägt war.

Chiu *et al.* zeigten, dass die TNF α -abhängige (engl.: *Tumor Necrosis Factor alpha*) Reduktion von VCAM durch Scherstress induziert wird [110]. DeVerse *et al.* fanden heraus, dass die Veränderung der Expression von der Intensität des Scherstress abhängt. So beschreiben die Autoren eine Erhöhung von VCAM um 150 % bei Scherstress von nur 2 dyn/ cm² während bei 12 dyn/ cm² eine Reduktion um 70 % im Vergleich zur statischen Kultur erfolgte [111]. Die untersuchten Zellen in der hier vorliegenden Arbeit wurden einem Scherstress von bis zu 40 dyn/ cm² ausgesetzt und zeigten eine ähnliche Reduktion der VCAM-Expression von auf Collagen als auch auf PU kultivierten Zellen.

Eine Untersuchung der auf BC aufgebrachten und konditionierten Zellen mittels PCR fand nicht statt. Laut Hersteller bildet sich bei der Kultivierung der Zellen auf BC eine so starke ECM, dass konventionelle Lysepuffer keinen ausreichenden Aufschluss der Zellen erzielen können. Eine Klärung dieses Sachverhalts sollte Teil fortführender Untersuchung zur BC als Trägermaterial für TE sein.

Abgesehen von den bereits erwähnten Ergebnissen zeigte sich, dass eine breitere Streuung in den verschiedenen Versuchsdurchläufen vorlag. Je Material waren jeweils 2 Versuche sehr erfolgreich während sich bei einem Versuch eine mangelhafte Besiedlung zeigte. Auffällig war, dass die schlechten Besiedlungen alle mit Zellen des gleichen Spenders erfolgt sind. Es ist daher anzunehmen, dass hier kein Versagen der Methode durch das Material oder den BR vorliegt sondern die Qualität der Zellen nicht ausreichend war. Die vorherige Qualitätskontrolle der Zellen mittels ICC hatte zwar keine Unterschiede der Zellqualität erkennen lassen, allerdings war die Proliferationsrate der Zellen reduziert.

Die in der Arbeit dargestellten Ergebnisse belegen den besonderen Nutzen des BR als umfassendes Werkzeug im Bereich der Gefäßersatzforschung und als mögliches Tool für die kommerzielle Entwicklung von TEVG. Der Bioreaktor ist in seiner Funktion validiert, und ein Protokoll zur Fertigung von besiedelten Scaffoldröhren ist etabliert.

Darüber hinaus wurden vier verschiedene Materialien auf ihre Besiedelbarkeit unter dynamischen Bedingungen hin überprüft und ausgewertet. Davon erwiesen sich dezellularisierte humane Venen als nicht geeignet für die Besiedlung mit FB und EC im BR während die Besiedlung von PU, Collagen und BC erfolgreich waren.

6 Ausblick

Dank der in dieser Arbeit erfolgreich abgeschlossenen Untersuchungen kann der BR in Zukunft unter anderem effektiv zur Testung von neuartigen und innovativen Materialien für das TE verwendet werden. Da durch die diversen Anschlüsse leicht definierte Mengen von Substanzen in den Kreislauf appliziert werden können, ist die Verwendung des BR in der Medikamententestung denkbar. Darüber hinaus ist es vorstellbar, dass der BR in der Gefäßproduktion „*at the bedside*“ Verwendung findet. Hierfür wäre die Entwicklung der Besiedlungskomponenten als Einwegmaterial wünschenswert.

Essentiell ist es, eine Pumpe mit dem Leistungsspektrum des Infusomat in das Setup des BR zu integrieren, um seinen ursprünglichen „all-in-one“-Vorteil wieder herzustellen.

Die guten Eigenschaften von PU als Gerüstmaterial für kardiales TE haben sich im Verlauf der Versuche wiederum bestätigt. Die Nachteile des Collagens als Scaffold zeigten sich anhand der Aktivierung der Zellen und des daraus resultierenden Abbaus des Materials. Schließlich ist BC als Zellträger für das kardiale TE sehr interessant, da die Zellen einen ruhenden Phänotyp ausbilden sollen. Insbesondere zur Langzeitkultivierung von Zellen auf dem Scaffold und zur Bevorratung von TEVG könnten sich Röhren aus BC als optimal herausstellen. Hierzu ist es erforderlich, die Wirkung von BC auf die Immunantwort des Empfängers hin zu untersuchen und die Besiedelbarkeit der Scaffolds weiter zu verbessern.

Es wäre für die Zukunft wünschenswert, ein Set von Markern für die verwendeten Zellen zu etablieren, welches eine Bewertung der Tauglichkeit der FB und EC zur Besiedlung von Gefäßprothesen zulässt. Schließlich sollten auch weitere Zellen, insbesondere EPC und HUVEC, für die Besiedlung von Scaffolds verwendet werden. Auch iPS-Zellen sind dank des immer besser werdenden Verständnisses für die Prozesse während der Differenzierung von Interesse [112]. Mit der Nutzung von Zellen aus Zellbanken könnte die Dauer zur Herstellung eines TEVG um ein bis zwei Wochen reduziert werden.

I. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
Aqua dest.	destilliertes Wasser (lat.: <i>aqua destillata</i>)
ASMA	engl.: <i>Alpha Smooth Muscle Actin</i>
BC	bakterielle Cellulose
bpm	engl.: <i>beats per minute</i>
BR	Bioreaktor
CAV	engl.: <i>Cardiac Allograft Vasculopathy</i>
CCC	engl.: <i>Collagen Cell Carrier</i>
d	Tag(-e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
EC	Endothelzellen (engl.: <i>endothelial cells</i>)
ECGM	engl.: <i>endothelial cell growth media</i>
ECM	extrazelluläre Matrix (engl.: <i>extracellular matrix</i>)
EPC	endotheliale Vorläuferzellen (engl.: <i>endothelial progenitor cells</i>)
ePTFE	expandiertes Polytetrafluorethylen
EtOH	Ethanol
FB	Fibroblasten
FCS	fötales Kälberserum (eng.: <i>foetal calf serum</i>)
FGM	engl.: <i>fibroblast growth media</i>
FN	Fibronectin
GMP	gute Herstellungspraxis (engl.: <i>Good Manufacturing Practice</i>)
h	Stunden
HE	Hämalaun-Eosin
HSA	humanes Serumalbumin
HUVEC	engl.: <i>human umbilical vascular endothelial cell</i>
IC	Immunzytochemie (engl.: <i>Immunocytochemistry</i>)
ICAM	engl.: <i>Intercellular Adhesion Molecule</i>
IHC	Immunhistochemie
IL	Interleukin
iPS-Zellen	induzierte pluripotente Stammzellen (engl.: <i>induced pluripotent stem cells</i>)
l	Liter
LDL	engl.: <i>Low-Density-Lipoprotein</i>
MCP-1	engl.: <i>Monocyte Chemotactic Protein-1</i>
mg	Milligramm
min	Minuten

ml	Milliliter
mm	Millimeter
p	Passage
PCR	Polymerasekettenreaktion (engl.: <i>polymerase chain reaction</i>)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung (engl.: <i>phosphat buffered saline</i>)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PU	Polyurethan
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
U/ min	Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SMC-Myosin	engl.: <i>smooth muscle cell myosin</i>
TE	engl.: <i>tissue engineering</i>
TEHV	engl.: <i>tissue engineered heart valves</i>
TEVG	engl.: <i>tissue engineered vascular graft</i>
TNF α	engl.: <i>tumor necrosis factor alpha</i>
U	Unit
ü.N.	über Nacht
VCAM	engl.: <i>Vascular Cellular Adhesion Molecule</i>
VE-Cad	engl.: <i>Vascular Endothelial Cadherin</i>
VSM	große Beinvene (lat.: <i>Vena saphena magna</i>)

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2-1: Darstellung des Aufbaus von Gefäßen (modifiziert nach [4])	8
Abbildung 2-2: Darstellung einer fortschreitenden Arteriosklerose in 4 Schritten nach [7].....	10
Abbildung 2-3: Ablauf der Herstellung eines TEVG. Nach Gewinnung eines patienteneigenen Gefäßes werden die Zellen isoliert, vermehrt und auf einem Scaffold aufgebracht. Das fertige TEVG kann dann dem Patienten eingesetzt werden. Abbildung modifiziert nach [36]	14
Abbildung 3-1: Polyurethan-Röhre mit 25 Schichten PU.....	18
Abbildung 3-2: Schematische Darstellung der Sprühvorrichtung, mit Reservoir mit Polymerlösung (17), dem Sprühkopf (10 - 18), dem beweglichen Stab (19) mit Motoren für die Rotation der Längsachse (21) und Schwenken um den Mittelpunkt (20) des Stabes. Entnommen aus dem Patent US 4474630A [78].	18
Abbildung 3-3: Collagen-Röhre mit 3,5 mm \varnothing , auf die verwendete Länge von 6 cm zugeschnitten	19
Abbildung 3-4: Röhre aus BC	20
Abbildung 3-5: Ein Stück Beinvene zur Gewinnung von primären Endothelzellen und Fibroblasten	20
Abbildung 3-6: Darstellung der Deckglasmethode zur Isolation von FB (grau). Die Venenstücke (gelb) werden in einer Zellkulturschale unter einem Deckglas, fixiert durch Silikontropfen (blau), positioniert. Die FB erreichen innerhalb von ca. 2 Wochen Konfluenz.	22
Abbildung 3-7: Zählquadrate der Neubauer-Kammer; ein auszuzählendes Großquadrat ist rot umrandet.	24
Abbildung 3-8: Bioreaktor zur Besiedlung und Konditionierung von Gefäßprothesen. Entnommen aus [77]	25
Abbildung 3-9: Übersicht von sterilisierten Komponenten des BR; a: Besiedlungszylinder und Reservoir, b: Schläuche sowie diverse Adapter.....	26
Abbildung 3-10: Besiedlung von BC in 2D. Die ersten 3 Wells sind mit Material von Röhren bestückt, die letzten 3 mit deutlich dünneren Patches. Zur Fixierung der Patches in einer 24-Well-Platte wurden Teflonröhrchen verwendet.	27

- Abbildung 3-11: Ansicht des Scaffoldhalters (1), an welchem mit chirurgischem Faden (2) zwei Venen (3) eingespannt sind. In der Abbildung sind noch die zunächst getesteten Luer-Lock-Adapter aus Metall (VBM Medizintechnik GmbH, Sulz, Deutschland) zu sehen. Diese wiesen nach mehrmaliger Verwendung Ablagerungen auf, so dass auf Nylonadaper umgestiegen wurde.27
- Abbildung 3-12: Darstellung des funktionsbereiten BR mit Mixer (1), Besiedlungszylinder (2), Einspritzstelle für die Zellen (3), Reservoir (4) sowie der Steuerungseinheit (5) zur Rotation der Scaffolds.28
- Abbildung 3-13: Finales Flussprofil zur Konditionierung von TEVG. Nach der Besiedlung (rote Sterne) mit FB ($t = 0$ h) wurde der Scherstress stufenweise zunächst auf 10 dyn/ cm^2 ($t = 6$ h) und dann auf 20 dyn/ cm^2 ($t = 24$ h) erhöht. EC wurden bei $t = 48$ h ausgesät und ebenso wie die FB perfundiert. Die Pulsation startet (grüne Sterne) bei $t = 24$ h, wird zur Aussaat der EC gestoppt und startet erneut bei $t = 72$ h. Nach 96 h wird der Scherstress schließlich auf 40 dyn/ cm^2 erhöht und 1 h später die TEVG geerntet (gelber Stern).....30
- Abbildung 3-14: Arbeitsplatz zur Anfertigung von Paraffinschnitten (a) mit Kryotom (1), Paraffinblöckchen (2), Kühleinheit (3) und beheizbarem Wasserbad (4), sowie eine absteigende Alkoholreihe zur Entparaffinierung der Präparate (b).....33
- Abbildung 4-1: REM-Aufnahmen der 4 verwendeten Scaffoldmaterialen (a bis h) vor Besiedlung von innen (links) und außen (rechts), sowie von einer nativen Vene (i, j). Durch die Aufnahmen werden deutliche Strukturunterschiede zwischen PU (a, b), Collagen (c, d), dezellularisierten Venen (e, f) und Röhren aus BC (g, h) sichtbar. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).....41
- Abbildung 4-2: Immunhistochemische Färbung einer dezellularisierten Vene gegen CD31 (a) und TE7 (b). Vereinzelt sind positive Markierungen für CD31 im tiefer gelegenen Gewebe zu finden (s. Kreis), während TE7 sowohl vereinzelt auf der luminalen Seite (s. Pfeile) als auch in den tiefer gelegenen Schichten der Vene (s. unterhalb der Sterne) detektierbar ist.....42
- Abbildung 4-3: Immunzytochemische Färbung von FB (a-f) und EC (g-i). FB sind positiv für die Marker TE7 (a), Fibronectin (e) und ASMA (f). Eine Schwache Positivität liegt für Collagen IV (c) und SMC-Myosin (d) vor. Die EC hingegen sind negativ für TE7 (g) und positiv für CD31 (h). Eine schwach positive Markierung liegt für VE-Cadherin in EC (i) vor. Maßstabsbalken: a, b, g und h: $100 \text{ }\mu\text{m}$, c bis f und i: $50 \text{ }\mu\text{m}$43
- Abbildung 4-4: Durch Undichtigkeiten am BR konnte Feuchtigkeit zwischen die Bodenplatte und die angeschraubten Komponenten gelangen, was zur Korrosion führte.44

- Abbildung 4-5: Querschnitt (a) und Aufsicht (b) des Besiedlungszylinders, bestehend aus einem zylinderförmigen Gehäuse (1) mit Schraubdeckel (2). Der Scaffoldhalter verfügt über einen Auslass (3) und einen Einlass (4) die mit 4 Stäben (5) adjustiert werden können. Die zwei simultan perfundierbaren TEVG (6) werden mit Gefäßkanülen (7) fixiert während die Stäbe mit Muttern aus Teflon (8) befestigt werden. Luer-Lock-Adapter (9) ermöglichen eine einfache Handhabung zur Befüllung des Zylinders und zur Verbindung mit dem Schlauchsystem (aus [82]).45
- Abbildung 4-6: Darstellung des ursprünglich angedachten Adapters zur Befestigung der Venen im Besiedlungszylinder (oben, Surge Cardiovascular, Bild von www.surgecardiovascular.com) gegenüber dem schließlich verwendeten Adapter (unten, Vieweg Dosier- und Mischtechnik, Bild von www.dosieren.de).45
- Abbildung 4-7: Isometrische Darstellung des Aufbaus des Bioreaktors mit Hinweis auf die notwendigen Umbaumaßnahmen für einen fehlerfreien Betrieb des BR.....47
- Abbildung 4-8: Messung der Druckverhältnisse im BR am Luer-Lock-Anschluss zum Scaffold bei einer Perfusion mit 12 ml/ min. Durch die Verwendung des Pulsers ergeben sich starke Druckunterschiede (rot), während ohne Einsatz des Pulsers nur sehr geringe Druckschwankungen auftreten (blau). Die Druckkurve mit Pulser erinnert an Systole und Diastole unter physiologischen Bedingungen.48
- Abbildung 4-9: Verbindung des BR mit einem Infusomat an Stelle der ursprünglich verwendeten Pumpe von Welco. Der Aufbau des BR in der Sterilwerkbank (a) erfolgte wie mit der anderen Pumpe. Um die Schläuche nicht in der Dichtung des Brutschranks abzuklemmen, wurden an der Tür Abstandshalter (siehe Kreise, b) installiert.48
- Abbildung 4-10: Finale Verbindung der einzelnen Komponenten des BR mit Schläuchen unter Verwendung der ursprünglichen Pumpe. Neben den hier sichtbaren 3-Wege-Hähnen (Pfeile) wurden die roten Verschlusskappen am Besiedlungszylinder auch durch 3-Wege-Hähne ersetzt (Sterne), was das Befüllen und Entlüften deutlich vereinfachte.49
- Abbildung 4-11: REM-Aufnahmen (a) und immunhistochemische Färbungen (b, c) der besiedelten PU-Röhren. PU war im Bioreaktor ohne Fluss gut zu besiedeln, es zeigte sich aber, dass die Zellschicht wenig adhärent war und die EC keinen pflastersteinförmigen Monolayer ausbildeten. Auch lösten sich die Zellen teilweise vom Scaffold. Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).50
- Abbildung 4-12: REM-Aufnahmen von PU-Proben mit verschiedenen Schichtdicken. Unabhängig von der Schichtdicke wies PU eine vergleichbare Morphologie im unbesiedelten

Zustand (links) auf. Auch ließ sich das PU bei jeder Schichtdicke sowohl mit FB (Mitte), als auch mit FB und EC (rechts) besiedeln. Vergrößerung: 1000-fach.....52

Abbildung 4-13: REM-Aufnahme eines unter statischen Bedingungen mit FB besiedelten CCC. Die Zellen weisen eine Vorzugsrichtung (in Pfeilrichtung) auf. Vergrößerung: 1000-fach.52

Abbildung 4-14: REM-Aufnahmen (a, d und g) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f, h, i) von besiedelten Collagen-Röhren in 3 verschiedenen Versuchsdurchläufen (1 = a-c, 2 = d-f, 3 = g-i). Die Besiedlung erwies sich in allen Versuchen als unvollständig. Darüber hinaus zeichnete sich das Material durch eine geringe Reißfestigkeit aus und konnte schnell beschädigt werden. Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).53

Abbildung 4-15: REM-Aufnahmen (a, d) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f) von im BR rebesiedelten dezellularisierten Venen. Es ist ein Beispiel für einen verhältnismäßig guten Besiedlungserfolg der dezellularisierten Vene (a-c), sowie für eine schlecht bis gar nicht besiedelte Vene (e-f) dargestellt. Der Zellverband löste sich allerdings auch bei der gut besiedelten Vene im Laufe der Präparation wieder ab (vgl. b, c). Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).54

Abbildung 4-16: REM-Aufnahmen (a, d) und immunhistochemische Färbungen (b, c, e, f) von besiedelter BC. Die Besiedlung war sowohl in Form eines Patches (a - c), als auch in Form der Röhre (d bis f) möglich. Es bildeten sich geschlossene Monolayer, welche bei den aufgeschnittenen Röhren aber durch die Probenvorbereitung fürs REM Risse bekamen (siehe d). Vergrößerung REM: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).55

Abbildung 4-17: REM-Aufnahmen der unter Fluss besiedelten PU-Röhren. Während bei hohem Fluss mit 18 ml/ min (a) keine Zellen am Material adhärieren konnten, blieben beim minimal einstellbaren Fluss von 12,5 ml/ min (b) vereinzelt Zellen am Scaffold haften und wiesen eine starke Ausrichtung in Flussrichtung (s. Pfeil) auf. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).56

Abbildung 4-18: REM-Aufnahmen von besiedelten PU-Röhren nach dem ersten Versuch mit geringerem Scherstress. Beim Mediumwechsel zur Besiedlung mit EC wurde eine FB-Röhre aus einem der zwei Scaffolds ausgespült (a). Insgesamt war die Besiedlung mangelhaft, da der Zellrasen Lücken aufwies und die Zellen bereits wieder abstarben (b). Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 100-fach (a) bzw. 500-fach (b) (kleines Bild).57

Abbildung 4-19: REM-Aufnahmen besiedelter PU-Röhren nach einem Protokoll, bei dem der maximale Scherstress 40 dyn/ cm² betrug und die Zellen insgesamt für 5 Tage kultiviert

wurden. Es fand sich ein glatter und homogener Zellrasen (a, b). Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).....	57
Abbildung 4-20: REM-Aufnahmen von besiedelten PU-Röhren nach einem Protokoll mit einem maximalen Scherstress von 70 dyn/ cm ² . Dies resultierte in einer weniger stabilen Besiedlung als der vorherige Versuch mit 40 dyn/cm ² (Abbildung 4-19). Es bildeten sich vermehrt Risse im Zuge der Präparation (a) und vereinzelt schienen sich Zellen wieder vom Zellverband abzulösen (b). Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).	58
Abbildung 4-21: REM-Aufnahmen von 3 unterschiedlichen Scaffolds (PU = a,b; Collagen = c,d; BC = e,f). Vollständige Konfluenz konnte bei allen Materialien erreicht werden (links). Bei je einem Versuchsdurchlauf ergab sich jedoch nur eine mangelhafte Besiedlung (rechts), was vermutlich auf die Qualität der Zellen zurückzuführen ist. Bei der schlechten Besiedlung stammten diese alle vom gleichen Spender. Vergrößerung: 1000-fach (großes Bild) und 500-fach (kleines Bild).	59
Abbildung 4-22: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von nativem Venenmaterial	63
Abbildung 4-23: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten PU- Röhren	64
Abbildung 4-24: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten Collagenröhren.....	65
Abbildung 4-25: Verschiedene immunhistochemische Färbungen von im BR mit FB und EC besiedelten Röhren aus bakterieller Cellulose.....	66
Abbildung 4-26: Mittelwerte der gemessenen RNA-Konzentration in ng/ µl für die Isolation der RNA aus nativem Venenmaterial (VSM), Zellen isoliert nach Besiedlung und Konditionierung im Bioreaktor auf den 3 verschiedenen Scaffolds sowie Zellen aus der Zellkultur (Kokultur von FB und EC). Auf bakterieller Cellulose und im nativen Material war der RNA-Gehalt so gering, dass eine Untersuchung der Proben mittels rt-PCR nicht möglich war.	67
Abbildung 4-27: Änderung des relativen mRNA-Gehalts der gemeinsam kultivierten FB und EC nach Besiedlung und Konditionierung auf PU bzw. Collagen im BR im Vergleich zu statisch kultivierten FB und EC in Zellkulturflaschen. Letztere weisen bei dieser Auswertungsmethode stets den Referenzwert 1 auf (rote Linie).	68

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: Ansprüche an optimale Gefäßprothesen sowie Vor- und Nachteile von Homografts und ePTFE-Prothesen [12]–[16]. Die Bedingungen sind zum Teil nicht erfüllt (-), bedingt erfüllt (+) oder vollständig erfüllt (++).....	12
Tabelle 3-1: Übersicht der Verdünnung und Hersteller der verwendeten Antikörper für IC, IHC für die Paraffinschnitte inklusive der dazugehörigen Demaskierungsverfahren und für die IHC an Kryoschnitten.....	35
Tabelle 4-1: Zusammenfassung des Besiedlungserfolges der verschiedenen Materialien....	68

IV. Literaturverzeichnis

- [1] "WHO | The top 10 causes of death," WHO, 2012. [Online]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en/>. [Accessed: 02-Jan-2016].
- [2] G. Andros and L. Lee, "Bypass Grafts: The State of the Art," *Scandinavian Journal of Surgery*, vol. 101, no. 2, pp. 100–106, Jun. 2012.
- [3] H. Suma, "Arterial grafts in coronary bypass surgery," *Ann Thorac Cardiovasc Surg*, vol. 5, no. 3, pp. 141–145, Jun. 1999.
- [4] "The Cardiovascular System: Blood Vessels." [Online]. Available: <http://classes.midlandstech.edu/carterp/Courses/bio211/chap19/chap19.html>. [Accessed: 30-Dec-2015].
- [5] R. Lüllmann-Rauch, *Taschenlehrbuch Histologie*. Stuttgart; New York, NY: Thieme, 2009.
- [6] A. M. Joussen, B. Kirchhof, and C. Gottstein, "Molekulare Mechanismen der Vaskulogenese und Angiogenese," *Der Ophthalmologe*, vol. 100, no. 4, pp. 284–291, Apr. 2003.
- [7] T. Quillard and P. Libby, "Molecular Imaging of Atherosclerosis for Improving Diagnostic and Therapeutic Development," *Circulation Research*, vol. 111, no. 2, pp. 231–244, Jul. 2012.
- [8] P. D. J. R. Schaefer, B. Hufnagel, B. Maisch, and J. Kriegelstein, "„Warum trifft der Herzinfarkt immer das Herz?“,“ *Herz*, vol. 35, no. 3, pp. 192–197, May 2010.
- [9] C. Eberhard-Metzger, *Herz in Gefahr? Ursachen, Prävention, Therapie - Ergebnisse aus der Herzkreislaufforschung*. 2006.
- [10] B. H. Walpoth and M. Möller, "Tissue Engineering von Gefäßprothesen," *Der Chirurg*, vol. 82, no. 4, pp. 303–310, Apr. 2011.
- [11] P. W. Serruys, M.-C. Morice, A. P. Kappetein, A. Colombo, D. R. Holmes, M. J. Mack, E. Ståhle, T. E. Feldman, M. van den Brand, E. J. Bass, and others, "Percutaneous coronary intervention versus coronary-artery bypass grafting for severe coronary artery disease," *New England Journal of Medicine*, vol. 360, no. 10, pp. 961–972, 2009.
- [12] J. Chlupáč, E. Filova, and L. Bačáková, "Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery.," *Physiological Research*, vol. 58, p. S119, 2009.
- [13] B. C. Isenberg, "Small-Diameter Artificial Arteries Engineered In Vitro," *Circulation Research*, vol. 98, no. 1, pp. 25–35, Dec. 2005.
- [14] N. L'Heureux, N. Dusserre, A. Marini, S. Garrido, L. de la Fuente, and T. McAllister, "Technology Insight: the evolution of tissue-engineered vascular grafts—from research to clinical practice," *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine*, vol. 4, no. 7, pp. 389–395, Jul. 2007.
- [15] O. E. Teebken and A. Haverich, "Tissue Engineering of Small Diameter Vascular Grafts," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 23, no. 6, pp. 475–485, Jun. 2002.
- [16] H. L. Prichard, R. J. Manson, L. DiBernardo, L. E. Niklason, J. H. Lawson, and S. L. M. Dahl, "An Early Study on the Mechanisms that Allow Tissue-Engineered Vascular Grafts to Resist Intimal Hyperplasia," *Journal of Cardiovascular Translational Research*, vol. 4, no. 5, pp. 674–682, Oct. 2011.
- [17] C. B. Weinberg and E. Bell, "A blood vessel model constructed from collagen and cultured vascular cells," *Science*, vol. 231, no. 4736, pp. 397–400, 1986.
- [18] T. Aper, A. Haverich, and O. Teebken, "New developments in tissue engineering of vascular prosthetic grafts," *VASA*, vol. 38, no. 2, pp. 99–122, May 2009.
- [19] W. E. Burkel, "The challenge of small diameter vascular grafts," *Med Prog Technol*, vol. 14, no. 3–4, pp. 165–175, 1989 1988.

- [20] J. D. Kakisis, C. D. Liapis, C. Breuer, and B. E. Sumpio, "Artificial blood vessel: The Holy Grail of peripheral vascular surgery," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 41, no. 2, pp. 349–354, Feb. 2005.
- [21] N. A. Peppas and R. Langer, "New challenges in biomaterials," *Science*, vol. 263, no. 5154, pp. 1715–1720, Mar. 1994.
- [22] N. L'Heureux, T. N. McAllister, and L. M. de la Fuente, "Tissue-engineered blood vessel for adult arterial revascularization," *N. Engl. J. Med.*, vol. 357, no. 14, pp. 1451–1453, Oct. 2007.
- [23] M. Zhou, Z. Liu, C. Liu, X. Jiang, Z. Wei, W. Qiao, F. Ran, W. Wang, T. Qiao, and C. Liu, "Tissue engineering of small-diameter vascular grafts by endothelial progenitor cells seeding heparin-coated decellularized scaffolds," *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, vol. 100B, no. 1, pp. 111–120, Jan. 2012.
- [24] S. C. Wood, X. Tang, and B. Tesfamariam, "Paclitaxel potentiates inflammatory cytokine-induced prothrombotic molecules in endothelial cells," *Journal of cardiovascular pharmacology*, vol. 55, no. 3, pp. 276–285, 2010.
- [25] R. Y. Kannan, H. J. Salacinski, P. E. Butler, G. Hamilton, and A. M. Seifalian, "Current status of prosthetic bypass grafts: A review," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 74B, no. 1, pp. 570–581, Jul. 2005.
- [26] P. DiMuzio, L. Fischer, S. McIlhenny, C. DiMatteo, N. Golesorkhi, D. Grabo, N. Tarola, A. Mericli, I. Shapiro, and T. Tulenko, "Development of a Tissue-Engineered Bypass Graft Seeded with Stem Cells," *Vascular*, vol. 14, no. 6, pp. 338–342, Nov. 2006.
- [27] A. Kawamoto and T. Asahara, "Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies," *Catheterization and Cardiovascular Interventions*, vol. 70, no. 4, pp. 477–484, Oct. 2007.
- [28] H. Gulbins, A. Pritisanac, M. Dauner, R. Petzold, A. Goldemund, M. Doser, B. Meiser, and B. Reichart, "Seeding of Human Vascular Cells onto Small Diameter Polyurethane Vascular Grafts," *The Thoracic and Cardiovascular Surgeon*, vol. 54, no. 2, pp. 102–107, Mar. 2006.
- [29] M. R. Alison, R. Poulson, S. Forbes, and N. A. Wright, "An introduction to stem cells," *The Journal of pathology*, vol. 197, no. 4, pp. 419–423, 2002.
- [30] E. Martin-Rendon and S. M. Watt, "Exploitation of stem cell plasticity," *Transfusion Medicine*, vol. 13, no. 6, pp. 325–349, Dezember 2003.
- [31] J. Ringe, C. Kaps, G.-R. Burmester, and M. Sittlinger, "Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs," *Naturwissenschaften*, vol. 89, no. 8, pp. 338–351, Aug. 2002.
- [32] S. Petit-Zeman, "Regenerative medicine," *Nat Biotech*, vol. 19, no. 3, pp. 201–206, März 2001.
- [33] W.-H. Zimmermann and T. Eschenhagen, "Cardiac tissue engineering for replacement therapy," *Heart Fail Rev*, vol. 8, no. 3, pp. 259–269, Jul. 2003.
- [34] M. F. Pittenger, A. M. Mackay, S. C. Beck, R. K. Jaiswal, R. Douglas, J. D. Mosca, M. A. Moorman, D. W. Simonetti, S. Craig, and D. R. Marshak, "Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells," *Science*, vol. 284, no. 5411, pp. 143–147, Apr. 1999.
- [35] G. Matsumura, N. Hibino, Y. Ikada, H. Kurosawa, and T. Shin'oka, "Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience," *Biomaterials*, vol. 24, no. 13, pp. 2303–2308, Jun. 2003.
- [36] T. Shin'oka, Y. Imai, and Y. Ikada, "Transplantation of a Tissue-Engineered Pulmonary Artery," *New England Journal of Medicine*, vol. 344, no. 7, pp. 532–533, Feb. 2001.
- [37] B. J. Ballermann, A. Dardik, E. Eng, and A. Liu, "Shear stress and the endothelium," *Kidney International*, vol. 54, pp. S100–S108, 1998.
- [38] A. Rademacher, M. Paulitschke, R. Meyer, and R. Hetzer, "Endothelialization of PTFE vascular grafts under flow induces significant cell changes," *Int J Artif Organs*, vol. 24, no. 4, pp. 235–242, Apr. 2001.
- [39] S. K. Yazdani, B. W. Tillman, J. L. Berry, S. Soker, and R. L. Geary, "The fate of an endothelium layer after preconditioning," *Journal of Vascular Surgery*, vol. 51, no. 1, pp. 174–183, Jan. 2010.

-
- [40] V. Barron, E. Lyons, C. Stenson-Cox, P. E. McHugh, and A. Pandit, "Bioreactors for Cardiovascular Cell and Tissue Growth: A Review," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 31, no. 9, pp. 1017–1030, Oct. 2003.
 - [41] D. J. Lee, J. Steen, J. E. Jordan, E. H. Kincaid, N. D. Kon, A. Atala, J. Berry, and J. J. Yoo, "Endothelialization of Heart Valve Matrix Using a Computer-Assisted Pulsatile Bioreactor," *Tissue Engineering Part A*, vol. 15, no. 4, pp. 807–814, März 2009.
 - [42] H.-C. Chen and Y.-C. Hu, "Bioreactors for tissue engineering," *Biotechnology Letters*, vol. 28, no. 18, pp. 1415–1423, Sep. 2006.
 - [43] N. Thottappillil and P. D. Nair, "Scaffolds in vascular regeneration: current status," *Vasc Health Risk Manag*, vol. 11, pp. 79–91, Jan. 2015.
 - [44] J.-M. Bourget, R. Gauvin, D. Larouche, A. Lavoie, R. Labbé, F. A. Auger, and L. Germain, "Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 33, no. 36, pp. 9205–9213, Dec. 2012.
 - [45] H. Gulbins, A. Goldemund, I. Anderson, U. Haas, A. Uhlig, B. Meiser, and B. Reichart, "Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves," *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery*, vol. 125, no. 3, pp. 592–601, März 2003.
 - [46] B. Akra, "A non-degradable polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering." 2010.
 - [47] G. Aleksieva, T. Hollweck, N. Thierfelder, U. Haas, F. Koenig, C. Fano, M. Dauner, E. Wintermantel, B. Reichart, C. Schmitz, and others, "Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering," *Biomed. Eng. Online*, vol. 11, no. 1, p. 92, 2012.
 - [48] K. N. F. Thierfelder, "In-vitro Vergleich von zellbesiedelten und konditionierten neu entwickelten Polyurethanaortenklappenprothesen und Homografts," Text.PhDThesis, Ludwig-Maximilians-Universität München, 2014.
 - [49] A. B. Cohen, M. Dagli, S. W. Stavropoulos, J. I. Mondschein, M. C. Soulen, R. D. Shlansky-Goldberg, J. A. Solomon, J. L. Chittams, and S. O. Trerotola, "Silicone and polyurethane tunneled infusion catheters: a comparison of durability and breakage rates," *J Vasc Interv Radiol*, vol. 22, no. 5, pp. 638–641, May 2011.
 - [50] K. L. Spilewski, J. M. Anderson, R. N. Schaap, and D. D. Solomon, "In vivo biocompatibility of catheter materials," *Biomaterials*, vol. 9, no. 3, pp. 253–256, May 1988.
 - [51] J. Glowacki and S. Mizuno, "Collagen scaffolds for tissue engineering," *Biopolymers*, vol. 89, no. 5, pp. 338–344, Mai 2008.
 - [52] M. A. Shokrgozar, M. Fattahi, S. Bonakdar, I. Ragerdi Kashani, M. Majidi, N. Haghighipour, V. Bayati, H. Sanati, and S. Nasirolddin Saeedi, "Healing Potential of Mesenchymal Stem Cells Cultured on a Collagen-Based Scaffold for Skin Regeneration," *Iran Biomed J*, vol. 16, no. 2, pp. 68–76, Apr. 2012.
 - [53] D. A. Stover and B. C. Verrelli, "Comparative Vertebrate Evolutionary Analyses of Type I Collagen: Potential of COL1a1 Gene Structure and Intron Variation for Common Bone-Related Diseases," *Mol Biol Evol*, vol. 28, no. 1, pp. 533–542, Jan. 2011.
 - [54] S. Arora and L. Gullestad, "The challenge of allograft vasculopathy in cardiac transplantation," *Curr Opin Organ Transplant*, vol. 19, no. 5, pp. 508–514, Oct. 2014.
 - [55] B. Skorić, M. Čikeš, J. L. Maček, Ž. Baričević, I. Škorak, H. Gašparović, B. Biočina, and D. Miličić, "Cardiac allograft vasculopathy: diagnosis, therapy, and prognosis," *Croat Med J*, vol. 55, no. 6, pp. 562–576, Dec. 2014.
 - [56] E. Olender, I. Uhrynowska-Tyszkiewicz, and A. Kaminski, "Revitalization of Biostatic Tissue Allografts: New Perspectives in Tissue Transplantation," *Transplantation Proceedings*, vol. 43, no. 8, pp. 3137–3141, Oct. 2011.
 - [57] W. K. Czaja, D. J. Young, M. Kaweck, and R. M. Brown, "The Future Prospects of Microbial Cellulose in Biomedical Applications," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 1, pp. 1–12, Jan. 2007.
 - [58] C. J. Malm, B. Risberg, A. Bodin, H. Bäckdahl, B. R. Johansson, P. Gatenholm, and A. Jeppsson, "Small calibre biosynthetic bacterial cellulose blood vessels: 13-months patency in a sheep model," *Scand Cardiovasc J*, vol. 46, no. 1, pp. 57–62, Oktober 2011.

- [59] A. Svensson, E. Nicklasson, T. Harrah, B. Panilaitis, D. L. Kaplan, M. Brittberg, and P. Gatenholm, "Bacterial cellulose as a potential scaffold for tissue engineering of cartilage," *Biomaterials*, vol. 26, no. 4, pp. 419–431, Feb. 2005.
- [60] M. Scherner, S. Reutter, D. Klemm, A. Sterner-Kock, M. Guschlbauer, T. Richter, G. Langebartels, N. Madershahian, T. Wahlers, and J. Wippermann, "In vivo application of tissue-engineered blood vessels of bacterial cellulose as small arterial substitutes: proof of concept?," *Journal of Surgical Research*, vol. 189, no. 2, pp. 340–347, Jun. 2014.
- [61] J. H. Campbell, J. L. Efendy, and G. R. Campbell, "Novel Vascular Graft Grown Within Recipient's Own Peritoneal Cavity," *Circulation Research*, vol. 85, no. 12, pp. 1173–1178, Dec. 1999.
- [62] M. R. Hoenig, "Tissue-Engineered Blood Vessels: Alternative to Autologous Grafts?," *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, vol. 25, no. 6, pp. 1128–1134, Jun. 2005.
- [63] M. Peck, D. Gebhart, N. Dusserre, T. N. McAllister, and N. L'Heureux, "The Evolution of Vascular Tissue Engineering and Current State of the Art," *Cells Tissues Organs*, vol. 195, no. 1–2, pp. 144–158, 2012.
- [64] O. E. Teebken, M. Wilhelmi, and A. Haverich, "Tissue Engineering für Herzklappen und Gefäße," *Der Chirurg*, vol. 76, no. 5, pp. 453–466, May 2005.
- [65] P. Zilla, D. Bezuidenhout, and P. Human, "Prosthetic vascular grafts: Wrong models, wrong questions and no healing," *Biomaterials*, vol. 28, no. 34, pp. 5009–5027, Dec. 2007.
- [66] I. Martin, T. Smith, and D. Wendt, "Bioreactor-based roadmap for the translation of tissue engineering strategies into clinical products," *Trends in Biotechnology*, vol. 27, no. 9, pp. 495–502, Sep. 2009.
- [67] Y. S. Morsi, W. W. Yang, A. Owida, and C. S. Wong, "Development of a novel pulsatile bioreactor for tissue culture," *Journal of Artificial Organs*, vol. 10, no. 2, pp. 109–114, Jun. 2007.
- [68] D. Wendt, S. A. Riboldi, M. Cioffi, and I. Martin, "Bioreactors in Tissue Engineering: Scientific Challenges and Clinical Perspectives," in *Bioreactor Systems for Tissue Engineering*, D. C. Kasper, P. M. van Griensven, and D. R. Pörtner, Eds. Springer Berlin Heidelberg, 2009, pp. 1–27.
- [69] C. Arrigoni, A. Chittò, S. Mantero, and A. Remuzzi, "Rotating versus perfusion bioreactor for the culture of engineered vascular constructs based on hyaluronic acid," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 100, no. 5, pp. 988–997, Aug. 2008.
- [70] K. Bilodeau, F. Couet, F. Boccafroschi, and D. Mantovani, "Design of a perfusion bioreactor specific to the regeneration of vascular tissues under mechanical stresses," *Artificial organs*, vol. 29, no. 11, pp. 906–912, 2005.
- [71] T. R. Dunkern, M. Paulitschke, R. Meyer, R. Büttemeyer, R. Hetzer, G. Burmester, and M. Sittiger, "A novel perfusion system for the endothelialisation of PTFE grafts under defined flow," *European journal of vascular and endovascular surgery*, vol. 18, no. 2, pp. 105–110, 1999.
- [72] P. Engbers-Buijtenhuijs, L. Buttafoco, A. A. Poot, P. J. Dijkstra, R. A. I. de Vos, L. M. T. Sterk, R. H. Geelkerken, I. Vermes, and J. Feijen, "Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor," *Biomaterials*, vol. 27, no. 11, pp. 2390–2397, Apr. 2006.
- [73] M. S. Hahn, M. K. McHale, E. Wang, R. H. Schmedlen, and J. L. West, "Physiologic Pulsatile Flow Bioreactor Conditioning of Poly(ethylene glycol)-based Tissue Engineered Vascular Grafts," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 35, no. 2, pp. 190–200, Jan. 2007.
- [74] S. Heydarkhan-Hagvall, M. Esguerra, G. Helenius, R. Söderberg, B. R. Johansson, and B. Risberg, "Production of extracellular matrix components in tissue-engineered blood vessels," *Tissue engineering*, vol. 12, no. 4, pp. 831–842, 2006.
- [75] R. Sodian, T. Lemke, C. Fritsche, S. P. Hoerstrup, P. Fu, E. V. Potapov, H. Hausmann, and R. Hetzer, "Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering," *Tissue engineering*, vol. 8, no. 5, pp. 863–870, 2002.

- [76] C. Williams and T. M. Wick, "Perfusion bioreactor for small diameter tissue-engineered arteries," *Tissue engineering*, vol. 10, no. 5–6, pp. 930–941, 2004.
- [77] A. Friedrich, *A New Seeding and Conditioning Bioreactor for Vascular Tissue Engineering*. 2011.
- [78] H. Planck and P. Ehrler, "Method for the production of synthetic blood vessel prosthesis," US4474630 A, 02-Oct-1984.
- [79] T. Schmidt, S. Stachon, A. Mack, M. Rohde, and L. Just, "Evaluation of a Thin and Mechanically Stable Collagen Cell Carrier," *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 17, no. 12, pp. 1161–1170, Dec. 2011.
- [80] G. Bertholdt, "Verfahren zur Herstellung eines langgestreckten Cellulosehohlkörpers," DE102006007412 B4, 2008.
- [81] M. Hofinger, G. Bertholdt, and D. Weuster-Botz, "Microbial production of homogeneously layered cellulose pellicles in a membrane bioreactor," *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 108, no. 9, pp. 2237–2240, Sep. 2011.
- [82] J. Schulte, A. Friedrich, T. Hollweck, F. König, M. Eblenkamp, A. Beiras-Fernandez, C. Fano, C. Hagl, and B. Akra, "A Novel Seeding and Conditioning Bioreactor for Vascular Tissue Engineering," *Processes*, vol. 2, no. 3, pp. 526–547, Jul. 2014.
- [83] S. E. McIlhenny, E. S. Hager, D. J. Grabo, C. DiMatteo, I. M. Shapiro, T. N. Tulenko, and P. J. DiMuzio, "Linear Shear Conditioning Improves Vascular Graft Retention of Adipose-Derived Stem Cells by Upregulation of the $\alpha 5\beta 1$ Integrin," *Tissue Engineering Part A*, vol. 16, no. 1, pp. 245–255, 2009.
- [84] M. J. Ott and B. J. Ballermann, "Shear stress-conditioned, endothelial cell-seeded vascular grafts: improved cell adherence in response to in vitro shear stress," *Surgery*, vol. 117, no. 3, pp. 334–339, Mar. 1995.
- [85] N. Haller, T. Hollweck, N. Thierfelder, J. Schulte, J.-M. Hausherr, M. Dauner, and B. Akra, "Noninvasive Analysis of Synthetic and Decellularized Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering:," *ASAIO Journal*, vol. 59, no. 2, pp. 169–177, 2013.
- [86] K. Yamamoto and J. Ando, "New Molecular Mechanisms for Cardiovascular Disease: Blood Flow Sensing Mechanism in Vascular Endothelial Cells," *Journal of Pharmacological Sciences*, vol. 116, no. 4, pp. 323–331, 2011.
- [87] M. Hoenicka, L. Wiedemann, T. Puehler, S. Hirt, D. E. Birnbaum, and C. Schmid, "Effects of Shear Forces and Pressure on Blood Vessel Function and Metabolism in a Perfusion Bioreactor," *Ann Biomed Eng*, vol. 38, no. 12, pp. 3706–3723, Dec. 2010.
- [88] E. Lyons and A. Pandit, "Disign of bioreactors for cardiovascular applications," in *Topics in Tissue Engineering*, 2005.
- [89] D. Massai, G. Cerino, D. Gallo, F. Pennella, M. Deriu, A. Rodriguez, F. Montevocchi, C. Bignardi, A. Audenino, and U. Morbiducci, "Bioreactors as Engineering Support to Treat Cardiac Muscle and Vascular Disease," *Journal of Healthcare Engineering*, vol. 4, no. 3, pp. 329–370, Aug. 2013.
- [90] A. A. Gurjarpadhye, M. R. DeWitt, Y. Xu, G. Wang, M. N. Rylander, and C. G. Rylander, "Dynamic Assessment of the Endothelialization of Tissue-Engineered Blood Vessels Using an Optical Coherence Tomography Catheter-Based Fluorescence Imaging System," *Tissue Eng Part C Methods*, vol. 21, no. 7, pp. 758–766, Jul. 2015.
- [91] S. L. M. Dahl, A. P. Kypson, J. H. Lawson, J. L. Blum, J. T. Strader, Y. Li, R. J. Manson, W. E. Tente, L. DiBernardo, M. T. Hensley, R. Carter, T. P. Williams, H. L. Prichard, M. S. Dey, K. G. Begelman, and L. E. Niklason, "Readily Available Tissue-Engineered Vascular Grafts," *Science Translational Medicine*, vol. 3, no. 68, pp. 68ra9–68ra9, Feb. 2011.
- [92] G. K. Naughton, "From Lab Bench to Market," *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 961, no. 1, pp. 372–385, Jun. 2002.
- [93] N. Raven, S. Schillberg, and S. Rasche, "Plant Cell-Based Recombinant Antibody Manufacturing with a 200 L Orbitally Shaken Disposable Bioreactor," in *Recombinant Proteins from Plants*, J. MacDonald, I. Kolotilin, and R. Menassa, Eds. Springer New York, 2016, pp. 161–172.
- [94] M. F. Q. Sousa, M. M. Silva, D. Giroux, Y. Hashimura, R. Wesselschmidt, B. Lee, A. Roldão, M. J. T. Carrondo, P. M. Alves, and M. Serra, "Production of oncolytic

- adenovirus and human mesenchymal stem cells in a single-use, Vertical-Wheel bioreactor system: Impact of bioreactor design on performance of microcarrier-based cell culture processes," *Biotechnol Progress*, vol. 31, no. 6, pp. 1600–1612, Nov. 2015.
- [95] G. L. Converse, E. E. Buse, K. R. Neill, C. R. McFall, H. N. Lewis, M. C. VeDepo, R. W. Quinn, and R. A. Hopkins, "Design and efficacy of a single-use bioreactor for heart valve tissue engineering," *J. Biomed. Mater. Res.*, p. n/a–n/a, Oktober 2015.
- [96] M. G. Jeschke, V. Hermanutz, S. E. Wolf, and G. B. Köveker, "Polyurethane vascular prostheses decreases neointimal formation compared with expanded polytetrafluoroethylene," *Journal of vascular surgery*, vol. 29, no. 1, pp. 168–176, 1999.
- [97] W. Trubel, H. Schima, A. Moritz, F. Raderer, A. Windisch, R. Ullrich, U. Windberger, U. Losert, and P. Polterauer, "Compliance mismatch and formation of distal anastomotic intimal hyperplasia in externally stiffened and lumen-adapted venous grafts," *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery*, vol. 10, no. 4, pp. 415–423, Nov. 1995.
- [98] G. K. Owens, "Regulation of differentiation of vascular smooth muscle cells," *Physiological Reviews*, vol. 75, no. 3, pp. 487–517, Jul. 1995.
- [99] B. Hinz, G. Celetta, J. J. Tomasek, G. Gabbiani, and C. Chaponnier, "Alpha-Smooth Muscle Actin Expression Upregulates Fibroblast Contractile Activity," *Mol Biol Cell*, vol. 12, no. 9, pp. 2730–2741, Sep. 2001.
- [100] J. Schulte, M. Weidig, P. Balzer, P. Richter, M. Franz, K. Junker, M. Gajda, K. Friedrich, H. Wunderlich, A. Östman, I. Petersen, and A. Berndt, "Expression of the E-cadherin repressors Snail, Slug and Zeb1 in urothelial carcinoma of the urinary bladder: relation to stromal fibroblast activation and invasive behaviour of carcinoma cells," *Histochemistry and Cell Biology*, vol. 138, no. 6, pp. 847–860, Dec. 2012.
- [101] S. H. Wilson, A. V. Ljubimov, A. O. Morla, S. Caballero, L. C. Shaw, P. E. Spoerri, R. W. Tarnuzzer, and M. B. Grant, "Fibronectin fragments promote human retinal endothelial cell adhesion and proliferation and ERK activation through alpha5beta1 integrin and PI 3-kinase," *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, vol. 44, no. 4, pp. 1704–1715, Apr. 2003.
- [102] W.-J. Yang, J. Hu, A. Uemura, F. Tetzlaff, H. G. Augustin, and A. Fischer, "Semaphorin-3C signals through Neuropilin-1 and PlexinD1 receptors to inhibit pathological angiogenesis," *EMBO Mol Med*, vol. 7, no. 10, pp. 1267–1284, Oct. 2015.
- [103] E. Pöschl, U. Schlötzer-Schrehardt, B. Brachvogel, K. Saito, Y. Ninomiya, and U. Mayer, "Collagen IV is essential for basement membrane stability but dispensable for initiation of its assembly during early development," *Development*, vol. 131, no. 7, pp. 1619–1628, Apr. 2004.
- [104] F. U. S. Mattace-Raso, T. J. M. van der Cammen, A. Hofman, N. M. van Popele, M. L. Bos, M. A. D. H. Schalekamp, R. Asmar, R. S. Reneman, A. P. G. Hoeks, M. M. B. Breteler, and J. C. M. Witteman, "Arterial Stiffness and Risk of Coronary Heart Disease and Stroke The Rotterdam Study," *Circulation*, vol. 113, no. 5, pp. 657–663, Feb. 2006.
- [105] J. N. Cohn, "Arterial Stiffness, Vascular Disease, and Risk of Cardiovascular Events," *Circulation*, vol. 113, no. 5, pp. 601–603, Feb. 2006.
- [106] A. E. Postlethwaite, R. Raghov, G. P. Stricklin, H. Poppleton, J. M. Seyer, and A. H. Kang, "Modulation of fibroblast functions by interleukin 1: increased steady-state accumulation of type I procollagen messenger RNAs and stimulation of other functions but not chemotaxis by human recombinant interleukin 1 alpha and beta," *J. Cell Biol.*, vol. 106, no. 2, pp. 311–318, Feb. 1988.
- [107] S. Yoshida, M. Ono, T. Shono, H. Izumi, T. Ishibashi, H. Suzuki, and M. Kuwano, "Involvement of interleukin-8, vascular endothelial growth factor, and basic fibroblast growth factor in tumor necrosis factor alpha-dependent angiogenesis," *Mol. Cell. Biol.*, vol. 17, no. 7, pp. 4015–4023, Jul. 1997.
- [108] F. Liang, N. Huang, B. Wang, H. Chen, and L. Wu, "Shear stress induces interleukin-8 mRNA expression and transcriptional activation in human vascular endothelial cells," *Chin. Med. J.*, vol. 115, no. 12, pp. 1838–1842, Dec. 2002.
- [109] M. Cheng, J. Wu, X. Liu, Y. Li, Y. Nie, L. Li, and H. Chen, "Low Shear Stress-Induced Interleukin-8 mRNA Expression in Endothelial Cells Is Mechanotransduced by Integrins and the Cytoskeleton," *Endothelium*, vol. 14, no. 6, pp. 265–273, Jan. 2007.

- [110] J.-J. Chiu, P.-L. Lee, C.-N. Chen, C.-I. Lee, S.-F. Chang, L.-J. Chen, S.-C. Lien, Y.-C. Ko, S. Usami, and S. Chien, "Shear Stress Increases ICAM-1 and Decreases VCAM-1 and E-selectin Expressions Induced by Tumor Necrosis Factor- α in Endothelial Cells," *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, vol. 24, no. 1, pp. 73–79, Jan. 2004.
- [111] J. S. DeVerse, A. S. Sandhu, N. Mendoza, C. M. Edwards, C. Sun, S. I. Simon, and A. G. Passerini, "Shear stress modulates VCAM-1 expression in response to TNF- α and dietary lipids via interferon regulatory factor-1 in cultured endothelium," *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, vol. 305, no. 8, pp. H1149–H1157, Oct. 2013.
- [112] J. P. Guyette, J. Charest, R. W. Mills, B. Jank, P. T. Moser, S. E. Gilpin, J. R. Gershlak, T. Okamoto, G. Gonzalez, D. J. Milan, G. R. Gaudette, and H. C. Ott, "Bioengineering Human Myocardium on Native Extracellular Matrix," *Circulation Research*, p. CIRCRESAHA.115.306874, Oct. 2015.

7 Eidesstattliche Versicherung

Schulte, Julia

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Etablierung einer neuen Methode zur bioreaktorgestützten Entwicklung von ‚Tissue Engineered Vascular Grafts““ selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Arbeiten von Kollegen oder Unterstützung der Arbeit durch Kollegen wurde in der vorliegenden Dissertation im Text und in der Danksagung deutlich gemacht.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

Meine Tätigkeit in dem Unternehmen Xellutec GmbH, Hersteller der bakteriellen Cellulose, hatte keinen Einfluss auf die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse der hier vorliegenden Arbeit.

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand

8 Lebenslauf

Name:	Julia Schulte
Geburtsdatum/ -ort:	14.04.1984/ Paderborn
Staatsangehörigkeit:	Deutsch
05/2014 - 03/2016	Projektmanagerin der Xellutec GmbH, Neuried
09/2011 - 06/2016	Bearbeitung der vorliegenden Promotion in der Arbeitsgruppe „kardiales Tissue Engineering“ von Dr. Akra und unter Leitung von Prof. Dr. Überfuhr am Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität, München
03/2009 - 08/2011	Diplomarbeit in der Arbeitsgruppe „Extrazelluläre Matrix“ bei Prof. Bernd am Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Jena, Friedrich-Schiller-Universität, Jena Thema: „Untersuchung zur Verteilung von EMT-Markern im Urothelzellkarzinom der Harnblase (UBC) – Einfluss tumorassoziierter Fibroblasten“
12/2007 - 02/2009	Wissenschaftliche Assistenz in der Arbeitsgruppe „Molekulare Kardiologie und Stammzellforschung“ von Prof. Wartenberg am Universitätsklinikums Jena, Friedrich-Schiller-Universität, Jena Forschungsprojekt: „Testung von Scaffold-Materialien für Tissue-Engineering mithilfe des in vitro Modells ‚Embryoid Body‘“
10/2004 - 08/2011	Studium der Biochemie an der Friedrich-Schiller-Universität, Jena; Diplom im Studienfach Biochemie
08/1994 - 06/2004	Abitur am Pelizaeus-Gymnasium, Paderborn
08/1990 - 06/1994	Grundschule, Altenbeken

9 Danksagung

Für die Möglichkeit, meine Promotion am Institut der Herzchirurgischen Klinik und Poliklinik der Universität München zu absolvieren bedanke ich mich bei dem Leiter Prof. Dr. Christian Hagl.

Bei Prof. Dr. Peter Überfuhr bedanke ich mich ganz herzlich für die Übernahme der Betreuung meiner Promotion, kritische Rückfragen, Geduld und stets motivierende Worte, insbesondere auf den „letzten Metern“.

Ebenso bedanke ich mich bei Prof. Dr. Thomas Koepfel und Prof. Dr. Stefan Käb für die Bereitschaft, an meiner Promotionsvorprüfung als Nebenprüfer aufzutreten.

Mein ganz besonderer Dank gilt Dr. Bassil Akra, der mir in seiner Arbeitsgruppe die Möglichkeit gegeben hat, im Bereich des kardialen Tissue Engineerings zu promovieren, was auch für mich persönlich ein überaus spannendes Thema ist. Darüber hinaus hat er mein Verständnis von anwendungsorientierter Forschung ganz entscheidend mit geprägt und mir während meiner Arbeit viel Freiraum für eigene Ideen gelassen. Hervorzuheben ist sein ausgeprägtes Engagement bei der Unterstützung meiner Arbeit. Bei Problemen oder Nachfragen konnte ich ihn jederzeit, auch während seiner Freizeit, um Rat bitten.

Für die Entwicklung des Bioreaktors und die Einweisung in die Programmierung des Gerätes bedanke ich mich ganz herzlich bei Anja Friedrich ohne deren Vorarbeit diese Arbeit nicht hätte entstehen können.

Für die freundliche Bereitstellung von Gerüstmaterialien danke ich den Firmen ITV Denkendorf, Viscofan und Xellutec GmbH ebenso wie PD Dr. Gerd Juchem. Den Patienten des Klinikums Großhaderns, deren Venenmaterial ich zur Isolation der Zellen verwenden durfte, gilt ein ganz besonderer Dank.

Bei meinen Kollegen möchte ich mich für viel Unterstützung, gute Gespräche und einfach eine tolle Zeit bedanken. Dr. Trixi Hollweck danke ich für ihre große Hilfsbereitschaft zu jeder Zeit, das Interesse an meiner Arbeit, konstruktive Kritik bei allen Veröffentlichungen und ihre tolle Art, durch die ich mich in der AG von Anfang an heimisch gefühlt habe. Ulrike Haas und Barbara Steinl gilt mein Dank für Ihre Hilfe im täglichen Laboralltag. Sie unterstützten mich mit vielen Tipps und bei Bedarf auch mit

aufmunternden Kommentaren oder tatkräftig. Fabian König danke ich außerordentlich für die Hilfe beim Umbau des Bioreaktors, für die Durchführung der Druckmessungen, für gute Gespräche und immer einen netten Spruch... und für ein Bügelbrett ☺ Mein Dank gilt auch ganz besonders Dr. Nikolaus Thierfelder, der mit seinen kritischen und konstruktiven Anmerkungen zu meinem Manuskript einen wertvollen Beitrag zu dieser Arbeit geleistet hat.

Bei meinem ehemaligen Jenaer Diplomarbeitsbetreuer Prof. Dr. Alexander Berndt bedanke ich mich für wissenschaftlichen Austausch, für die Durchführung der immunhistochemischen Färbung der kryokonservierten Präparate und ein immer offenes Ohr ebenso wie seine immer offenen Worte.

Für die freundliche Unterstützung bei der Probeneinbettung in Paraffin sowie die Erlaubnis zur Verwendung von Geräten und Materialien seien an dieser Stelle Frau Henn und Frau Knörndel aus dem Zentrum für Neuropathologie und Prionenforschung am Klinikum der Universität München dankend erwähnt.

Ein besonderer Dank gilt auch Herrn Simon, Herrn Mayer und Herrn Gaida, den Mitarbeitern der Laborwerkstatt des Klinikums. Mit viel Geduld beantworteten sie technische Fragen und setzten sämtlich Umbaumaßnahmen und Wartungen des Bioreaktors genauso wie sonstige Sonderwünsche zügig und gewissenhaft um.

Abschließend möchte ich mich bei meinen Freunden und meiner Familie für den Rückhalt und das Vertrauen während dieser Arbeit und meines gesamten Studiums bedanken. Insbesondere seien hier Toni, Ulrich und meine Eltern erwähnt.

10 Vorveröffentlichung:

Auf den folgenden Seiten ist der Originalartikel „A Novel Seeding and Conditioning Bioreactor for Vascular Tissue Engineering“, in dem Teile dieser Dissertation vorab publiziert wurden, aufgeführt. Die Copyright-Richtlinien des Journals „*processes*“ wurden dabei entsprechend berücksichtigt.

Darüber hinaus wirkte ich an der Publikation „Noninvasive Analysis of Synthetic and Decellularized Scaffolds for Heart Valve Tissue Engineering“ als Ko-Autor mit.

Im Rahmen meiner Arbeit vertrat ich die Arbeitsgruppe mit dem Beitrag „A novel all-in-one bioreactor for vascular tissue engineering“ bei der 41. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Thorax-, Herz- und Gefäßchirurgie 2012 in Freiburg sowie auf der *8. International Conference on Cell Therapy for Cardiovascular Disease* 2013 in New York.

Article

A novel seeding and conditioning bioreactor for vascular tissue engineering

Julia Schulte ¹, Anja Friedrich ², Trixi Hollweck ¹, Fabian König ¹, Markus Eblenkamp ², Andres Beiras-Fernandez ³, Cornelia Fano ⁴, Christian Hagl ¹ and Bassil Akra ^{1*}

¹ Department of Cardiac Surgery, Laboratory for Tissue Engineering, Medical Center Munich University, Munich, Germany; E-Mail: Julia.Schulte@med.uni-muenchen.de; Trixi.Hollweck@med.uni-muenchen.de; Fabian.Koenig@med.uni-muenchen.de; Christian.Hagl@med.uni-muenchen.de

² Institute of Medical and Polymer Engineering, Technische Universität München, Garching, Germany; E-Mail: anja.friedrich@mytum.de; markus.eblenkamp@tum.de

³ Department of Thoracic and Cardiovascular Surgery, Johann Wolfgang Goethe University, Frankfurt, Germany; E-Mail: Andres.Beiras@kgu.de

⁴ Institute of Textile Technology and Process Engineering, Denkendorf, Germany; E-Mail: cornelia.fano@itv-denkendorf.de

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: Bassil.Akra@med.uni-muenchen.de; Tel.: +49 (0)89 7095-6465; Fax: +49 (0)89 7095-8873.

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: Multiple efforts have been made to develop small-diameter tissue engineered vascular grafts using a great variety of bioreactor systems at different steps of processing. Nevertheless, there is still an extensive need for a compact all-in-one system providing multiple and simultaneous processing. The aim of this project was to develop a new device to fulfil the major requirements of an ideal system that allows simultaneous seeding, conditioning and perfusion. The newly developed system can be actuated in a common incubator and consists of six components: a rotating cylinder, a pump, a pulse generator, a control unit, a mixer and a reservoir. Components that are in direct contact with cell media, cells and/ or tissue allow sterile processing. Proof-of-concept experiments were performed with polyurethane tubes, collagen tubes and decellularised human veins. The scaffolds were seeded with fibroblasts and endothelial cells that were isolated from human saphenous vein segments. Scanning electron microscopy and immunohistochemistry showed better seeding success of polyurethane

scaffolds in comparison to the other two groups. Conditioning of the best-colonised scaffold material with 100 dyn/ cm² resulted in cell detachments, whereas a moderate conditioning program with stepwise increase of shear stress from 10 to 40 dyn/ cm² induced a stable and confluent cell layer. The new bioreactor presents a powerful tool for the development and evaluation of tissue engineered vascular grafts for human application and/ or for medical product testing.

Keywords: Tissue engineering, bioreactor, vascular graft, polyurethane, collagen, decellularised tissue

1. Introduction

Chronic ischemic heart disease, coronary artery disease and cardiac infarction are the most common causes of death worldwide, accounting for 25.6 % of all fatal casualties [1]. Mainly they are caused by a restriction of the coronary circulation commonly affected by atherosclerotic occlusion [2].

The use of patient's native veins to replace faulty blood vessels is still the silver bullet in clinical practice [3,4]. Although minimal invasive techniques seem to outstrip the conventional vascular replacement [5], surgical bypass is still performed in numerous patients [6]. Coronary artery bypass grafting (CABG) using intact autologous veins results in less events of stroke, myocardial infarction (MI) or repeated revascularisation in long-term application compared to percutaneous coronary intervention (PCI) [7,8]. The results of the SYNTAX study from 2011 [9,10] permit the identification of patients that have a greater benefit from bypass surgery instead of PCI.

Upon some patients that cannot be treated with PCI and/ or those that do not possess adequate autologous vessel material for CABG, there is still an increasing need for new innovative implants [11]. Native vessels and conventional PTFE grafts show various limitations like reocclusion, aneurysm formation and/ or thrombogenicity. Processing techniques for artificial grafting aim to overcome these limitations by enabling the development of smaller graft diameters (inner diameter < 6 mm) [4,12,13]. Currently, there are multiple approaches under investigation to develop an ideal graft. Apart from a small number of scaffold-free concepts, organic or synthetic, degradable or non-degradable scaffolds are in common use [4].

An untreated surface often leads to rejection, requiring coatings like heparin to avoid occlusion by clotting [14] or paclitaxel to suppress hyperplasia [15]. The different coatings have a great positive value on the performance of the scaffold material, however, the integrity of these coatings is compromised in most of the cases at high flow rates [16]. Another promising strategy is seeding of the graft with endothelial cells (ECs) [17,18]. This unstable cell-matrix-interaction can be supported and guaranteed by pre-seeding the new prosthesis with vascular fibroblasts (FBs) mimicking the cellular structure of healthy subjects [19,20]. Various cell sources like stem cells [21], endothelial progenitor cells [22] or isolated vascular ECs [23] are under investigation for graft seeding. Depending on their origin, stem cells come up to a high growth and repair potential as reported in many cases [24-26].

Embryonic stem cells for therapeutic purpose reveal ethical and legal concerns, and are therefore not currently used for tissue engineering investigation. Tumour formation is an actual risk of embryonic stem cells due to their indefinite propagation as well as immunologic intolerance caused by the allogeneic nature [24,26-28]. Without any ethical concerns adult stem cells can be derived from the patient and are therefore autologous in nature. Additional possible sources are bone marrow, peripheral blood, skeletal muscle and on long term, placental cord blood. However, the induced transdifferentiation of adult stem cells at the necessary efficiency is infeasible. If these disadvantages remain unsolved embryonic and adult stem cells cannot be regarded as standard options for tissue engineering [26,27,29].

In contrast, autologous differentiated ECs derived from the saphenous vein segments do not require any immune suppression and have no carcinogenic potential. The invasive surgical procedure associated with the sacrifice of intact vascular donor tissue is the exigency for a safe cell source [30].

In addition to material surface modification, it is known that shear stress and transmural pressure influence the shape and biosynthesis of vascular cells. The effects are structural remodelling and flattening of ECs as well as activation of signalling cascades [31,32]. In case of inappropriate or absent signals, cells only poorly proliferate, lose cell-cell contacts and their ability to form organised tissues [33,34]. The cells dedifferentiate and no extracellular matrix (ECM) is established. In summary, mechanical stress is essential for the achievement of a good quality ECM [35].

Due to the above listed essential conditions for the development of a cell-based graft, different bioreactors were developed in the last years to simulate physiological conditions, such as temperature, blood flow, shear stress or mechanical strain. These systems play a crucial role in building tissue engineered constructs [36]. They can be used for seeding and conditioning as well as for mechanical stress tests under physiological conditions [37]. As a general rule, the development of tissue engineered implants should be realized in a sterile system under stable physiological conditions (shear stress and blood flow) [17,31,38,39] allowing reproducible and low cost processes. They should enable the observation of different parameters like CO₂, nutrients and growth factors to guarantee a good manufacturing practice [40].

So far, only few research groups have developed bioreactors with the capability to perform dynamic seeding and pulsatile flow processes of multiple grafts under physiological conditions simultaneously [41-48]. Therefore, the aim of this study was to develop an all-in-one BR offering comparative test results, adjustable process parameters and simple handling.

2. Experimental Section

2.1. Bioreactor development

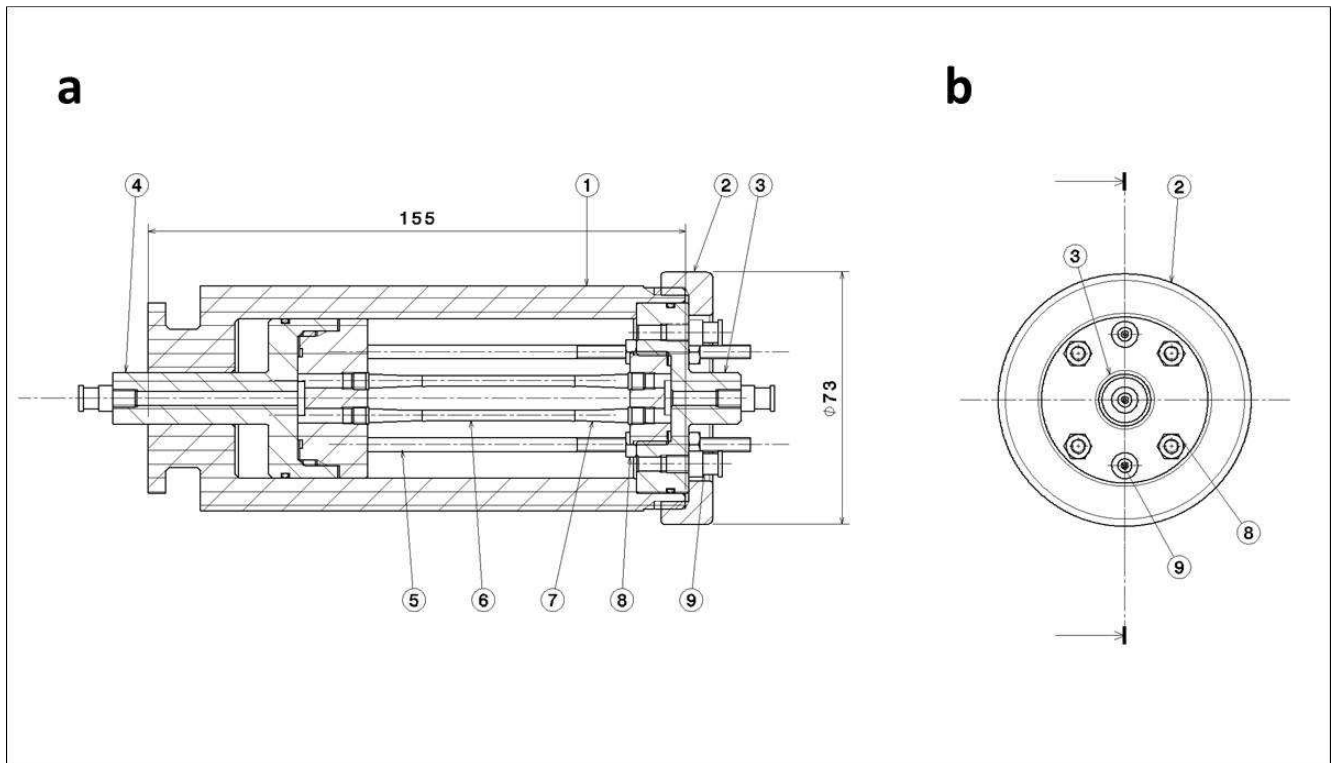
2.1.1. Construction

All parts were designed using the computer-aided software Catia V5R19 (Dassault Systèmes, Vélizy-Villacoublay, France). Non-electric BR components were manufactured in-house. Parts that are in contact with cell media, cells and/ or tissue were developed in a way that allows reprocessing. The BR system consists of six components: a seeding cylinder, a rotating mixer, a media reservoir, a control unit, a roller pump and a pulse generator. All parts are assembled on a square ground plate made of polyvinylchloride (PVC) with a length $l = 400$ mm and height $h = 15$ mm. The dimensions allow the actuation of the bioreactor in a standard incubator.

Seeding device

The seeding device (Figure 1) comprises a cylinder filled with cell culture medium surrounding the TEVG. In the cylinder, two pairs of fixed vessel cannulas allow a simultaneous perfusion of two TEVGs. The housing of the cylinder with an outer diameter $D = 65$ mm, an inner diameter $d = 46$ mm, an outer height $H = 155$ mm and an inner height $h = 130$ mm is made from polymethyl methacrylate (PMMA) and narrows to $d = 15$ mm before one cylinder's ending. In this part the cylinder offers a guide rail (depth = 15 mm, $l = 10$ mm) to secure the cylinder position on the mixer. On the opposite ending, a metric thread (M64x1.5) is milled to lock the cylinder with a screw cap ($D = 73$ mm, $d = 48$ mm, $h = 15$ mm) and a step (depth = 14 mm) with $d = 55$ mm is created to countersink the integrated scaffold carrier of the seeding device.

Figure 1. Transversal section (a) and top view (b) of the seeding device (a) composed of a cylindric housing (1) with screw cap (2). The scaffold carrier with an outlet (3) and an inlet (4) is adjusted with four spacers (5) and allows a simultaneous perfusion of two TEVGs (6). The scaffolds are fixed with vessel cannulas (7) while the spacers are fixed with screw nuts (8). Luer-Lock-adapters (9) simplify filling processes and connection to the tubing system



The scaffold carrier of the seeding device is composed of an outlet (Figure 1, (3), $d = 46$ mm, $h = 28.5$ mm with a nose of $d = 15$ mm, $h = 45$ mm) and an inlet (Figure 1, (4), $d = 55$ mm, $h = 15$ mm with a nose of $d = 15$ mm, $h = 15$ mm and outlet) made of polyoxymethylene (POM). Both elements are composed of two parts to generate branched supply channels, exemplified in detail for the outlet in Figure 2 and Figure 3.

Figure 2. Top view (a), bottom view (b) and transversal section (c) of the outer part of the outlet with a bore hole (1) for the perfusion media, a bore hole (2) for filling the seeding cylinder, a bore hole (4) for the spacers, a thread (3) for screwing the inner part of the outlet in place and an indentation (5) to keep a gasket in place.

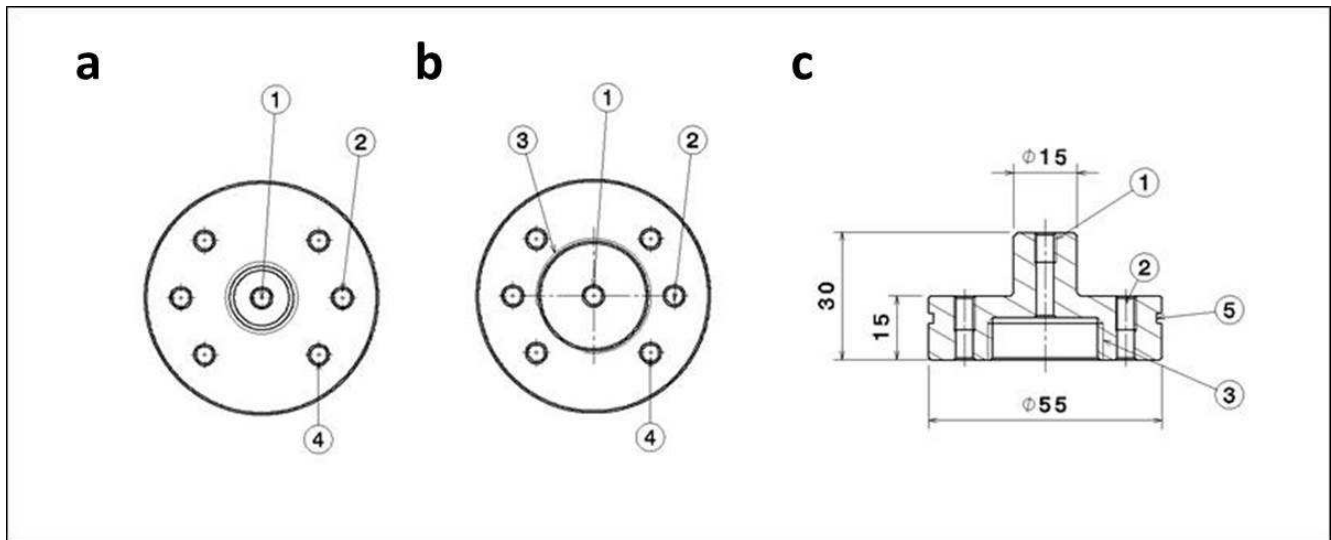
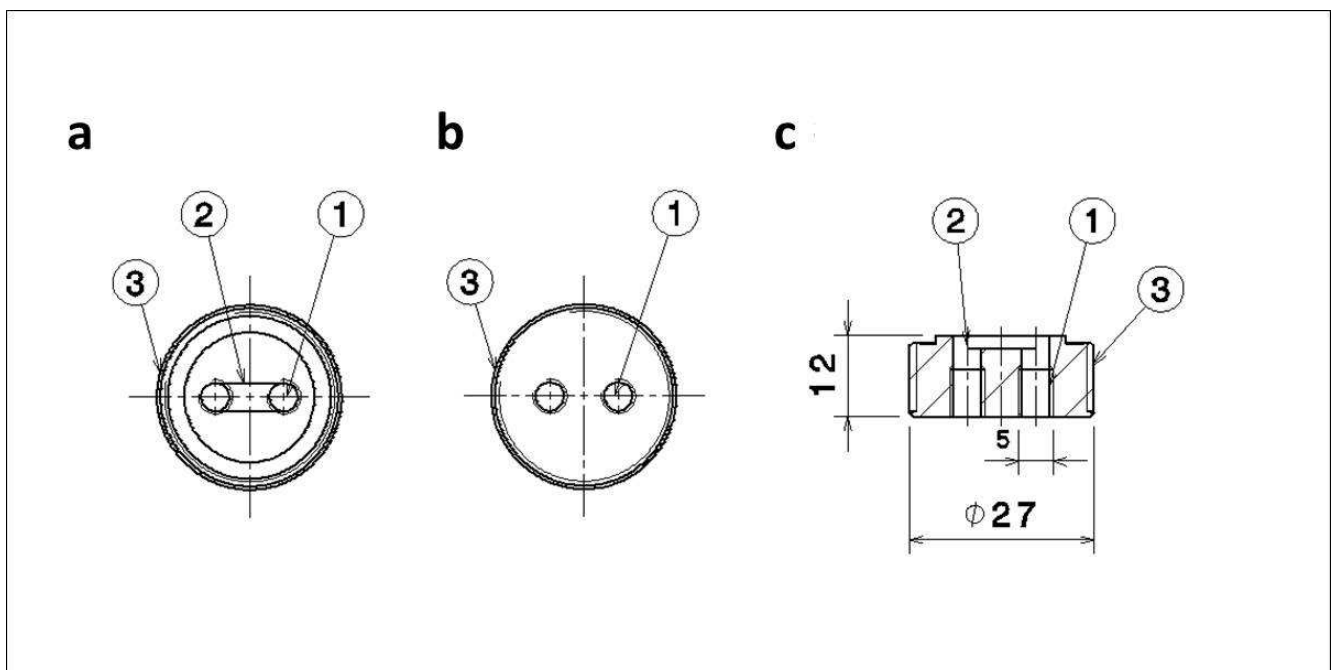


Figure 3. Top view (a), bottom view (b) and transversal section (c) of the inner part of the outlet with a bore hole (1) for perfusion media, a furrow (2) to generate a branched supply channel and a thread (3) for screwing the inner part of the outlet in its outer part.



The distance of the inlet and the outlet is regulated by four spacers made of medical grade steel (Figure 1, (5), $d = 4$ mm, $h = 150$ mm) that are positioned in a radius of 38 mm. The BR channels (Figure 1, (1)) with a diameter of 4 mm are arranged parallelly in a distance of 10 mm. The Luer-Lock adapters for the vessel grafts are countersunk into the channels. Two rotatable Luer-Lock connectors are mounted on the inlet and outlet to allow parallel rotational seeding and perfusion procedures. Two

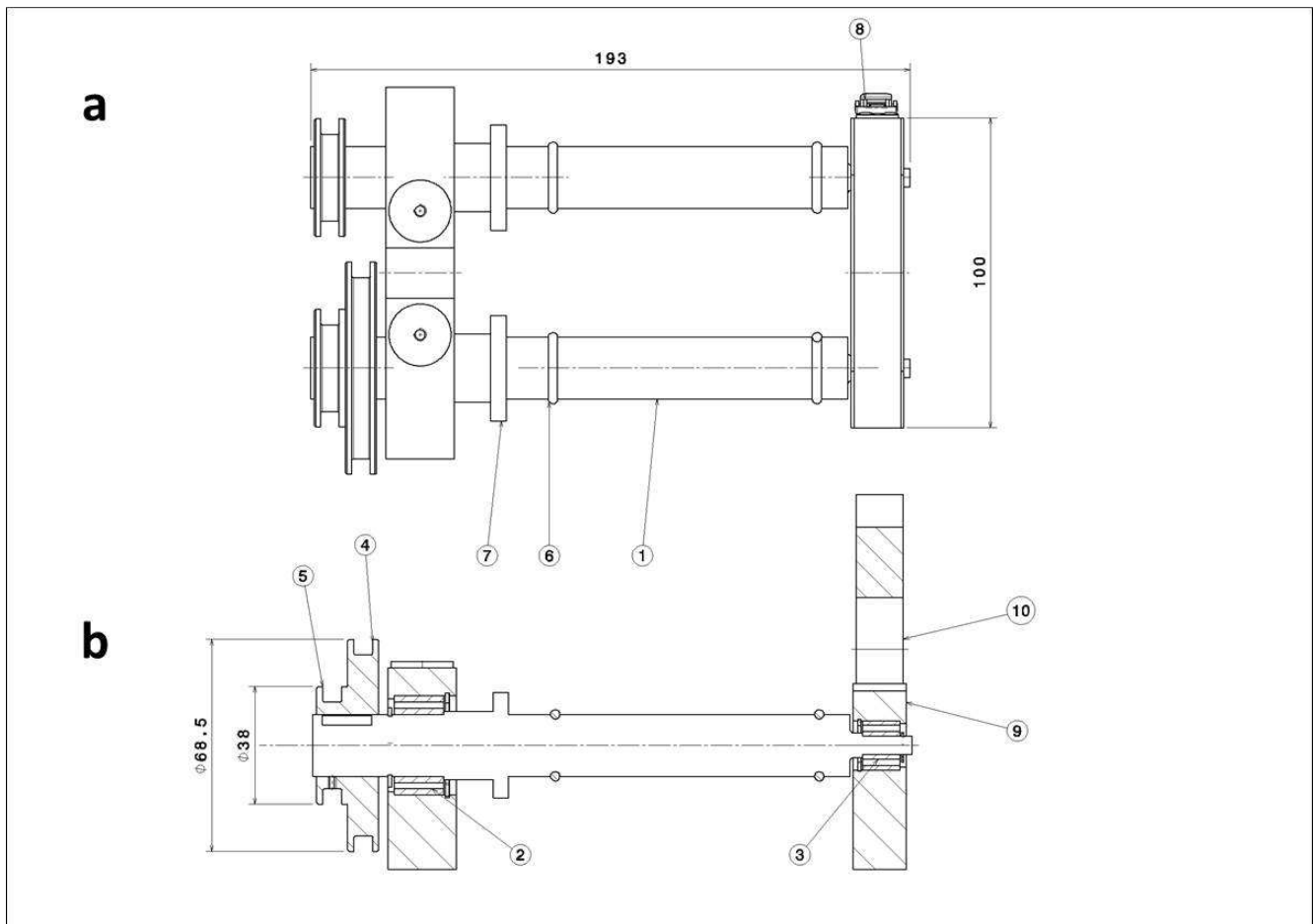
additional Luer-Lock connectors are attached to the lid for filling processes. O-rings are used as sealing elements to ensure fluid transport without leakage. The scaffold carrier is positioned into the seeding cylinder and secured by the closure of the lid.

The seeding device has a maximum capacity of 130 ml, depending on the spacer offset. It has an outer radius of 65 mm and an overall length of 200 mm with a net weight of 600 g.

Mixer

For dynamical rotation the seeding cylinder is placed on the mixer (Figure 4). All external parts of the mixer are manufactured from aluminium. The design is based on commercially available roller mixers. Two drive shafts with $l = 193$ mm and narrowing diameters ($d = 20 - 6$ mm) are mounted on a base with a distance of 61.5 mm. Grooved ball bearings (20 x 32 x 7 mm, 6804 2RS) and miniature ball bearings (6 x 16 x 15, S696A 2RS) are used for each shaft. The front shaft is driven by a wheel ($D = 68.5$ mm, $d = 58.5$ mm) connected to a gear motor with a belt drive. The back shaft is connected with the first shaft by two wheels ($D = 38$ mm, $d = 28.5$ mm) and a belt drive. Two O-rings on each shaft and a guardrail prevent the seeding cylinder from slipping during rotation. A retaining bracket, locked by two spring loaded latches, allows prompt fixation of the seeding cylinder.

Figure 4. Top view of the mixer (a) and a transversal section through the front shaft (b). The mixer is composed of two shafts (1), ball bearings (2, 3,) and wheels (4, 5) for rotation. An O-ring (6) prevents the seeding cylinder from slipping. A guardrail (7) and a latch (8+10) secure the seeding cylinder on the mixer. The shafts are assembled on a base (9).

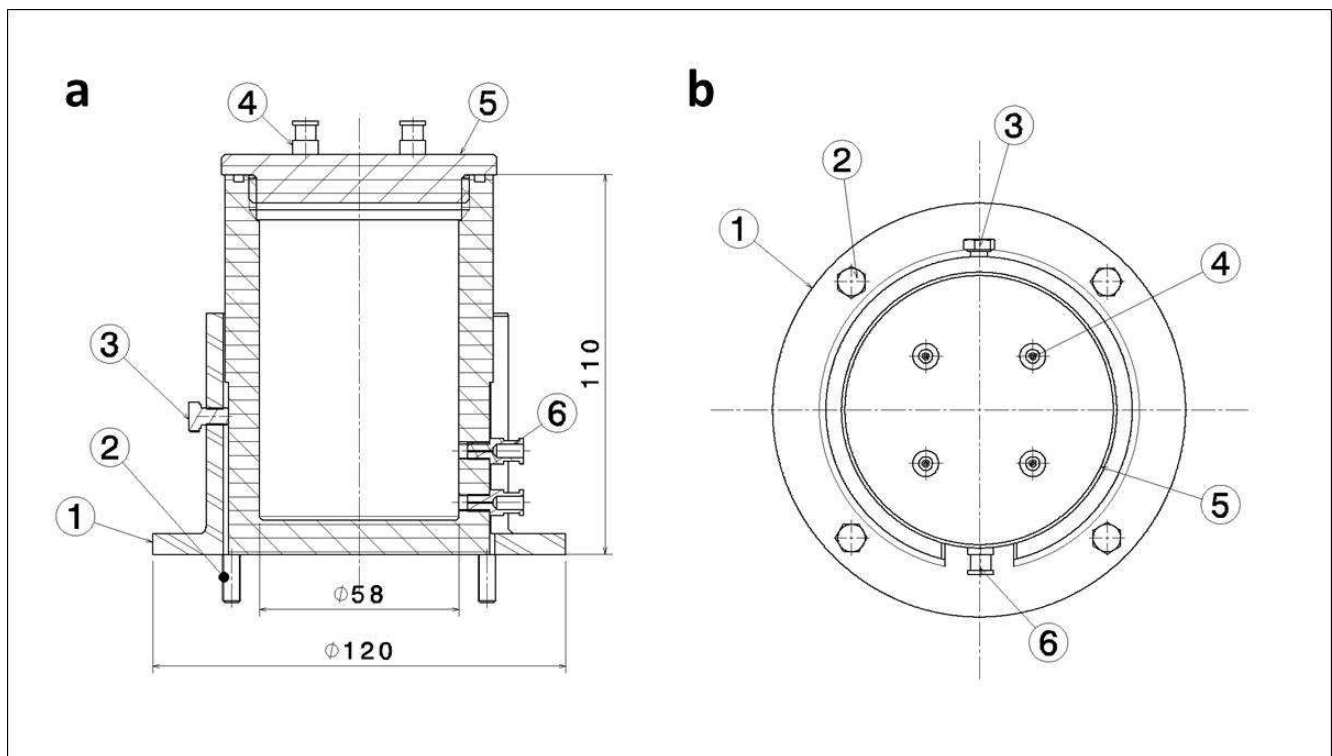


Media reservoir

The media reservoir (Figure 5; $D = 78$ mm, $d = 58$ mm, $H = 110$ mm, $h = 100$ mm) manufactured from PMMA has a capacity of 220 ml. Two Luer-Lock adapters are fixed to the reservoir wall in a distance of 15 mm and 30 mm to the reservoir bottom. The screw cap of the reservoir ($D = 80$ mm, $d = 58$ mm, $H = 14$ mm, $h = 7$ mm) contains four Luer-Lock adapters in a radius of 44 mm. A gasket ring secures a tight closure of the reservoir.

The reservoir is placed in an aluminium stub ($D = 89$ mm, $d = 79$ mm, $h = 10$ mm). An aluminium ring ($D = 120$ mm, $h = 6$ mm) enables the fixation to the ground plate via screws. The reservoir stub provides a gap of 20 mm for M5 Luer-Lock connectors of the reservoir. A M5 Teflon screw on the opposite side of the gap secures the position of the reservoir.

Figure 5. Transversal section (a) and top view (b) of the media reservoir of the bioreactor with a stub (1) screwed to the ground plate (2), a Teflon screw (3), M5-Luer-Lock adapters (4) in the cap (5) and further M5-Luer-Lock adapters (6) in the bottom.



A peristaltic roller pump (WELCO Co. Ltd., Tokyo, Japan) is used for circulating perfusion through the BR. The speed of this pump is regulated by a speed controller (10 A, Conrad Electronic SE, Hirschau, Germany) with a potentiometer (wirewound linear, 10 k Ω , 2 W, Conrad Electronic SE, Hirschau, Germany). The pump is combined with an eccentric device (pulser) driven by a DC-motor compressing the scaffold tubes periodically resulting in a pulse right in front of the seeded scaffolds at a defined frequency. This prevents a loss of impulse through the tubes.

A programmable logic controller (PLC, Siemens LOGO! 12/14 RC) was chosen to control all electronic devices by using the *Logo! Soft Comfort software*. The user panel with display and control buttons enables the control of the program parameters during the experiment.

Purchased parts were made of stainless steel (Luer-Lock connectors, ball bearings), medical grade polymers (tubing material), nylon (vessel cannulas) and nitrile butadiene rubber (NBR; O-rings). Medical laboratory equipment such as Luer-Locks (VBM Medizintechnik GmbH, Sulz, Germany; Hell & Co GmbH, Diespeck, Germany), vessel cannulas (Vieweg GmbH, Kranzberg, Germany), syringe filters (Millex-GS, Merck Millipore, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), medical tubes (Deutsch & Neumann GmbH, Berlin, Germany) and tube connectors (Vieweg GmbH, Kranzberg, Germany) are CE marked sterile devices and are therefore qualified for the intended application.

2.1.2. Sterilisation

The sterilisation of the bioreactor is restricted to the components in contact with cells and/ or cell culture medium; in detail, the seeding cylinder, the scaffold carrier, the reservoir, the tubing system and the adapters. The sterilisation was performed by formaldehyde deposition at 60–70 °C for 7 h. Samples for sterilization verification were aseptically taken at 24, 72 and 96 h after incubation at 37 °C/ 5 % CO₂ and were screened for contaminations by conventional microbiological evaluation methods (Max-von-Pettenkofer-Institut für Hygiene und medizinische Mikrobiologie, University of Munich, Germany).

2.1.3. Functionality

The bioreactor functionality was checked during a standard sequence as described in 2.4.1 and 2.4.2, in the environment of a standard incubator at 37 °C and 5 % CO₂. The safe connection of all parts and the timed rotation as well as the start of perfusion and pulsation was examined. The cell media was macroscopically inspected for cloudiness or color change through the transparent housings of the reservoir and the seeding device.

2.2. Scaffold materials

Three different scaffold materials were selected for seeding with the bioreactor's setup: polyurethane (PU), collagen and decellularised human veins (Figure 6).

The PU vessel prostheses were manufactured by the ITV-Denkendorf (Denkendorf, Germany) using spraying technique [23]. Randomly oriented Polyurethane (PU) fibres offer a mean diameter of 1.55 µm and form a tube with a wall thickness of 0.3 mm and an inner diameter of 6 mm. For seeding purpose PU was γ-sterilised at 10 kGy by a certified service provider for medical device sterilisation.

Collagen tubes manufactured by using bovine origin material were supplied from Viscofan Bioengineering (Weinheim, Germany) free of charge. The tubes have an inner diameter of 3.5 mm and a length of 80 mm.

Human vein leftovers from coronary artery bypass operations were obtained from the medical center of the Munich University – LMU (Munich, Germany) for research purposes. Samples were only taken with the patients' informed consent and were processed anonymously, with no individual patient-related data. The veins were stored in M199 for 24 h and were decellularised in PBS supplemented with 0.5 % Sodium dodecyl sulphate and 0.5 % Sodium deoxycholate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) for 24 h at room temperature (RT). Decellularised homografts were washed six times for 24 h with PBS at RT to remove cellular toxins. After decellularisation the veins could be reseeded in the BR. The inner vein diameter was less than 6 mm with a length of at least 60 mm.

Figure 6. PU tube (a; l = 50 mm, d = 6 mm), a collagen tube (b; l = 60 mm, d = 3.5 mm (with kind permission of Viscofan Bioengineering) and a decellularised vein (c; l = 60 mm, d = varying between 3 and 6 mm).



2.3. Cell source

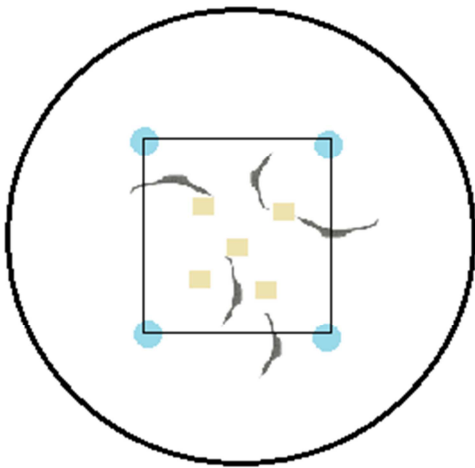
2.3.1. Cell Isolation and sub culturing

ECs and FBs were isolated from remaining saphenous vein segments, after bypass operations with informed consent from patients. Veins were stored at 4 °C in M199 media (Biochrom AG, Berlin, Germany) supplemented with 1 ml Penicillin-Streptomycin (5000 U and 5 mg/ ml, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) for a maximum of 5 d until the isolation process. Segments were cannulised and rinsed with M199 containing 0.2 % heparin (5000 I.E., Ratiopharm GmbH, Ulm, Germany) and 0.5 % gentamycin (10 mg/ ml, Biochrom AG, Berlin, Germany). For EC isolation, veins were filled twice with 14 mg collagenase II (280 U, Worthington Biochemical Corporation, NJ, USA) soluted in 10 ml 1 % HSA (human serum albumin, CLS Behring, Bern, Switzerland) and were each incubated for 15 min at in PBS (Biochrom AG, Berlin, Germany) at physiological conditions in the incubator. Obtained cell suspensions were rinsed out, centrifuged for 7 min at 500 rpm and finally cultivated in Endothelial Cell Growth Medium (ECGM, Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 6 % fetal calf serum (Lonza GmbH, Köln, Germany) and 0.2 % penicillin/ streptomycin (Sigma–Aldrich GmbH, Hamburg, Germany) in standard culture flasks (T12.5 cm², Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Germany) at 37 °C/ 5 % CO₂. For FB isolation a coverslip

method was used. The veins were sliced (1 mm^2), transferred into a cell culture dish (Nunc GmbH & Co.KG, Wiesbaden, Germany), and placed below a coverslip fixed by silicone drops (Figure 7).

FBs cultivation was analogously performed to ECs using Fibroblast Growth Medium (FGM, Promocell GmbH, Heidelberg, Germany) supplemented with 11 % fetal calf serum and 0.2 % penicillin/streptomycin, respectively. Medium was changed every 2 - 3 days. Cells were passaged at confluency in a ratio of 1:14 at P1 and in a ratio of 1:3 at P2.

Figure 7. Coverslip method for FB isolation. Vein slices (1 mm^2 , yellow) were positioned in a cell culture dish under a coverslip which is fixed by silicone drops (blue). Outgrowing FBs (grey) reached confluency within two weeks.



2.3.2. Cell characterisation

FB and EC were phenotypic characterised by morphological observation and immunocytochemical staining (ICC) in 8-well-chamber slides (BD Bioscience, Franklin Lakes, USA) using specific antibodies as previously described [49]. Briefly, vascular cells were stained against EC-specific CD31 ($10.25 \mu\text{g}/\text{ml}$; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) and FB-specific TE-7 ($2 \mu\text{g}/\text{ml}$, Millipore Corporation BioScience Division, Temecula, CA, USA), respectively according to manufacturer's protocol using EnVisionTM+ Dual Link System-HRP (Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany).

2.4. Bioreactor setups

2.4.1. Seeding protocol

The scaffold tubes - PU, collagen or human decellularised veins - were clamped to the Luer-Lock adapters in the scaffold carrier and were fixed with surgical threads (Ethicon, Johnson & Johnson Medical GmbH, Norderstedt, Germany). The seeding device was assembled and filled with FGM. FBs ($750.000 \text{ cells}/\text{cm}^2$) were colonized on the PU lumen by rotating the seeding cylinder on the mixer

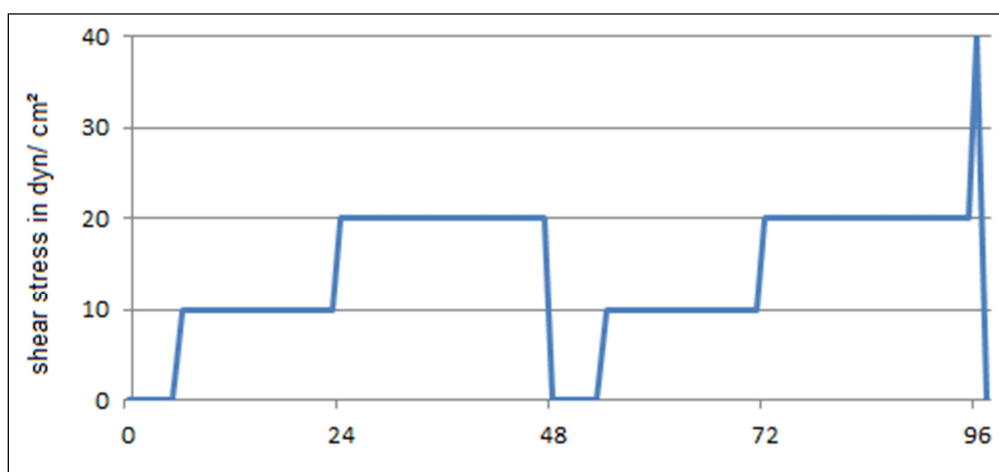
according to a defined seeding cycle for 7 h. The cycle comprised rotation for 20 s clockwise and 30 s anti-clockwise with a holding phase of 20 min between each rotation. The seeding device stops at different points after each rotation and allows the cells to attach all over the scaffolds surface. 3 d after cell seeding FGM was replaced by ECGM. ECs ($750.000 \text{ cells/ cm}^2$) were analogously seeded to the lumen and cultured for another 3 d. Samples were taken for immunohistochemistry (IHC) and scanning electron microscopy (SEM).

2.4.2. Perfusion protocol

A preliminary perfusion experiment was performed with PU scaffolds ($n = 3$). 24 h after FB-seeding with a rotation of the seeding cylinder as described above, tubes were perfused with a laminar flow of 12 ml/ min (shear stress = 100 dyn/ cm^2) for 2 d. After EC-seeding ($750.000 \text{ cells/ cm}^2$), the tubes were analogously perfused. After 6 d in total, the tubes were exposed to pulsatile flow conditions by actuating the pulse generator for 24 h.

After the preliminary perfusion experiments the pump was modified. An optimised perfusion protocol was used. The seeding time was reduced to 6 h and the perfusion period was extended to 36 h with a lower and stepwise increase of the shear stress from 10 to 40 dyn/ cm^2 , as shown in Figure 8. The pulse generator started 24 h after cell seeding with a break of 24 h of pulsation after EC seeding. Samples were taken for SEM and IHC.

Figure 8. Perfusion protocol of the conditioned TEVGs. After FB seeding ($t = 0 \text{ h}$) the shear stress was gradually raised to 10 dyn/ cm^2 ($t = 6 \text{ h}$) and 20 dyn/ cm^2 ($t = 24 \text{ h}$). EC were seeded at $t = 48 \text{ h}$ and were analogously perfused to FB. The pulsation starts at $t = 24 \text{ h}$, stops after EC seeding and restarts at $t = 72 \text{ h}$. After 96 h the shear stress was finally increased to 40 dyn/ cm^2 for 1 h.



2.5. Sample Evaluation

2.5.1. Scanning electron microscopy (SEM)

SEM was used to detect the surface topography of native and seeded scaffolds. Specimens were fixed in a solution composed of 456 ml aqua bi-distilled (Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v. d. H., Germany), 0.75 ml 1 N hydrochloric acid (Titrisol, Merck KGaA, Darmstadt, Germany), 43.5 ml glutaraldehyd and 5.65 g sodium cocodylatetrihydrate (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany) at 4 °C for 24 h at least. Samples were dehydrated in an ascending ethanol series (30 %, 50 %, 70 % and 96 %) and subsequently in 99.9 % ethanol at -20 °C. Specimens were dried at the critical point, sputtered with gold for 180 s at 10^{-5} mbar and analysed using a SEM (EVO® LS 10; Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen, Germany).

2.5.2. Immunohistochemistry (IHC)

Immunohistochemical analysis was performed to detect EC and FB after scaffold's seeding. For this aim, seeded samples were primarily fixed in 4 % formaldehyde (Microcos GmbH, Garching, Germany) for 10 days at 4 °C. Fixed samples were paraffin-embedded and sectioned at 5 µm. Slices were stained against CD31 (ECs; 10.25 µg/ ml; Dako Deutschland GmbH, Hamburg, Germany) and TE-7 (FBs; 2 µg/ ml, Millipore Corporation BioScience Division, Temecula, CA, USA). Specimens were blocked for endogenous peroxidase and incubated with primary antibody at 4 °C overnight. After washing with PBS, samples were covered with biotinylated link for 10 min and HRP Streptavidin-label for 10 min according to manufacturer's protocol (HRP-Detection Kit, Biozol GmbH, Eching, Germany). Chromogen labelling was conducted for 10 min using AEC-Peroxidase-Substrate Kit (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA). All incubation steps were performed at RT. Cell nuclei were stained with hemalaun (1:4 in PBS; Merck KGaA, Darmstadt, Germany). Controls for non-specific binding of chromogen label were performed by excluding the primary antibody. A bright field microscope was used to observe all stained samples (Carl Zeiss MikroImaging GmbH, Göttingen, Germany).

3. Results and Discussion

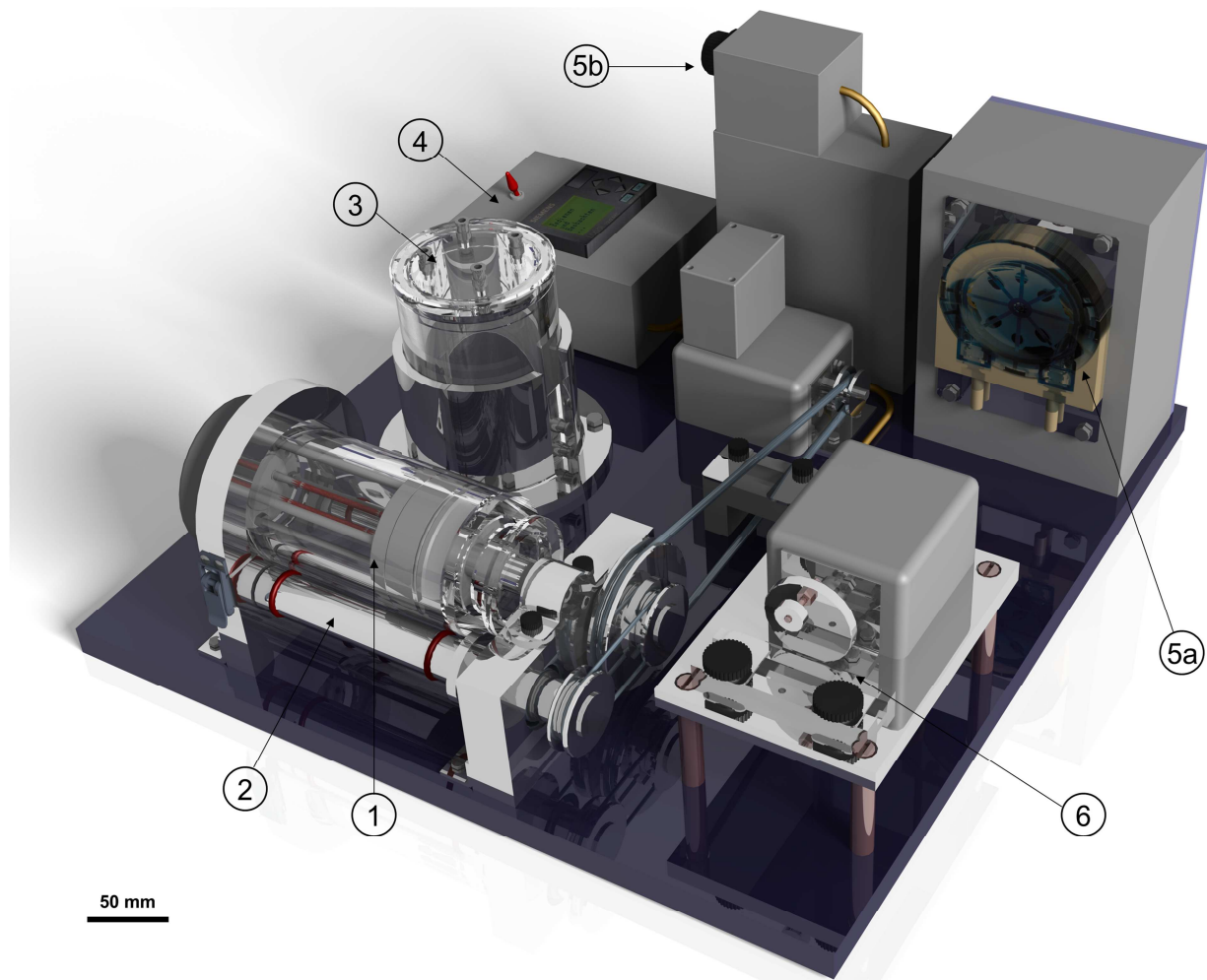
3.1. Bioreactor Assembly

BRs for the generation of TEVGs are often bulky systems that require handling by highly trained persons [50-52].

The new BR is constructed in a way that allows an assembly in a laminar flow cabinet without any additional tools like screwdrivers or the need of saturation of the scaffolds to assemble them with the BR. As shown in Figure 9, the novel all-in-one BR consists of six components: a seeding device (1) on a mixer (2), a media reservoir (3) a control unit (4) routing the gear motors for the mechanical components (2, 5 and 6), a peristaltic pump (5a) with modifiable speed, adjusted through a potentiometer (5b) and a pulse generator (6). A great benefit of the bioreactor is the compact assembly

of the components on a stable baseplate. This allows an easy and quick handling and transportation which grants stability during all possible processes such as seeding and conditioning process.

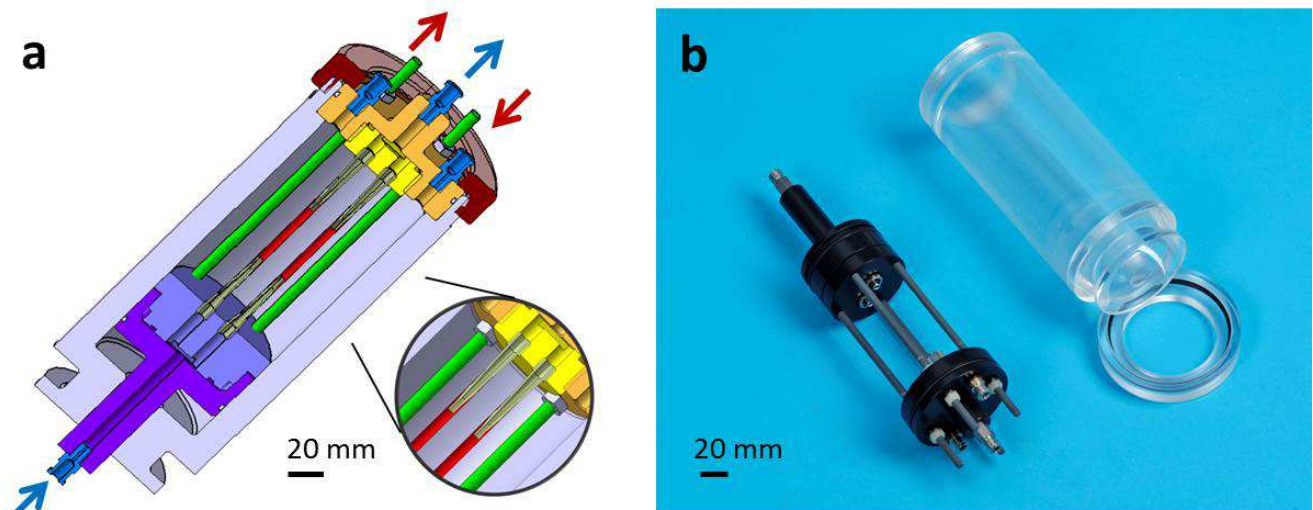
Figure 9. Rendering of the CATIA data of the all-in-one bioreactor with seeding device (1), rotating mixer (2), media reservoir (3), control unit (4), roller pump (5a) with potentiometer (5b) and pulse generator (6). Tubing and electric wiring are not displayed.



The seeding cylinder (Figure 10) could be implemented with two TEVGs connected to the tubing system for the perfusion procedure. In contrast to other systems [42,53], this dual fixture allows the comparison of different scaffold materials under the same settings. TEVGs (a, red) are located in the cylinder centre and are connected to the media circulation via standard Luer-Lock connectors (a, blue, flow in the direction of the blue arrows). The Luer-Lock connectors (a, blue, flow in direction of the red arrows) on the bioreactors outlet (a, orange and yellow) allow filling processes and media exchange. The scaffold carrier can be adjusted to the length of the TEVG by increasing the spacer distance (a, green). For connecting the vessel grafts to the scaffold carrier, the grafts are fixed with a surgical thread to the male Luer-Lock adapters with tube connectors. The tube connectors are assembled with the female Luer-Lock adapters of the inner parts of the inlet (a, violet) and the outlet

(a, yellow). Finally, the scaffold carrier is inserted into the scaffolds housing and fixed by screwing the cap on top. Manufacturing of the seeding cylinder from PMMA provides optical transparency for macroscopic observation of processes within the unit (b).

Figure 10. (a) Sectional view of the seeding cylinder with scaffolds (red), inlet (purple and violet), outlet (orange and yellow), spacers (green), Luer-Lock adapters (blue), housing (grey) and screw cap (brown); (b) final implementation of the seeding cylinder.



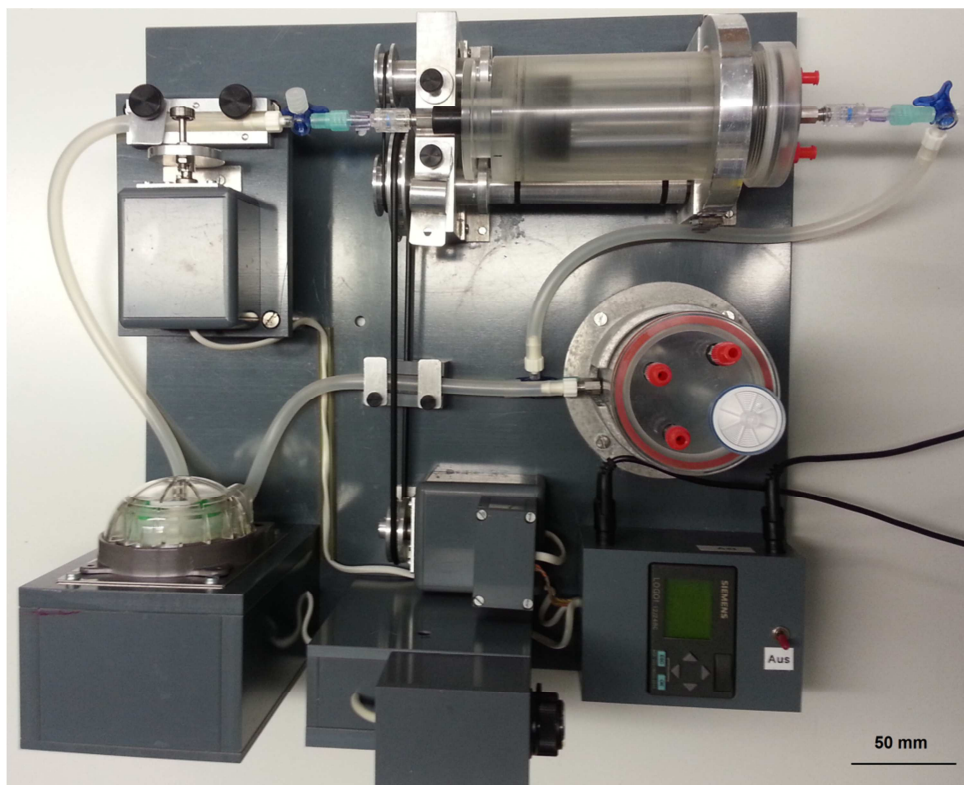
3.2. Bioreactor Sterility

Culture medium was checked for contamination during the bioreactor run at 24, 72 and 96 h by conventional streak samples. The microbiological evaluation was performed at the Max-von-Pettenkofer-Institute for Hygiene and Medical Microbiology (University of Munich, Munich, Germany). The examinations showed no microbiological contamination in a period of 15 days, indicating the possibility of long-term dynamic studies under sterile conditions.

3.3. Bioreactor Function

Luer-Lock adapters with tube connectors ensure an easy connection of the BR components by tubes. After filling the BR with media, sterile degasing of the tubing system can be quickly performed with a syringe via the three-way stopcocks. Using the three-way stopcock directly in front of the seeding device allows an accurate injection of the cell suspension to the scaffold for seeding purpose.

Figure 11. Assembly of the all-in-one BR with connection of all subunits via simple tubing system.



Conditioning of the cells under pulsatile flow conditions raise the tolerance of the tissue-engineered products to shear stress, pressure [31,32,54] and thrombotic events [17]. As shown in Figure 11 the seeding device rotates on the mixer to ensure uniform cell seeding all over the scaffold's surface. The media reservoir guarantees a sufficient nutrient supply and gas exchange for the cells during cultivation. The flow rate can be adjusted by regulating the pump speed during the run with the potentiometer. The pump allows a slow increase of the shear stress from 5 dyn/ cm² up to 100 dyn/ cm² to enable a cell adaption to shear stress and the development of an ECM. The control unit route a workflow to actuate the pump, the pulse generator and the rotating mixer. The roller pump realises a slightly pulsatile flow through the seeded vascular graft while the pulse generator mimics heartbeat. The combination of these features in one BR which is easy to handle and works properly in a standard incubator is unique.

3.4. Experimental evaluation of the bioreactor

FBs and ECs from the *vena saphena magna* can be isolated rapidly in large quantities, extensively expanded in culture and can be well recovered after repeated freezing/ thawing cycles. As previously described, [55], cells from this source are already used successfully for seeding of PU heart valve scaffolds. Peck *et al.* [56] described, that the costs for a TEVG grows with its complexity. The sole use of ECs would reduce time and effort in the production of TEVGs. However, Feugier *et al.* [57] postulated the benefit of coating scaffolds with extra cellular matrix (ECM) proteins to raise ECs

adherence. Furthermore fibronectin, laminin and tenascin-C splice variants, proteins of the ECM, are known to promote neoangiogenesis and endothelial differentiation [58-60]. FBs are mesenchymal cells and synthesise these proteins. Moreover, the adventitia contributes in vascular tone. In this context, Laflamme *et al.* demonstrated that a tissue engineered vascular adventitia, reconstructed with vascular fibroblasts derived from human adventitia, has the capability of contraction and relaxing [61].

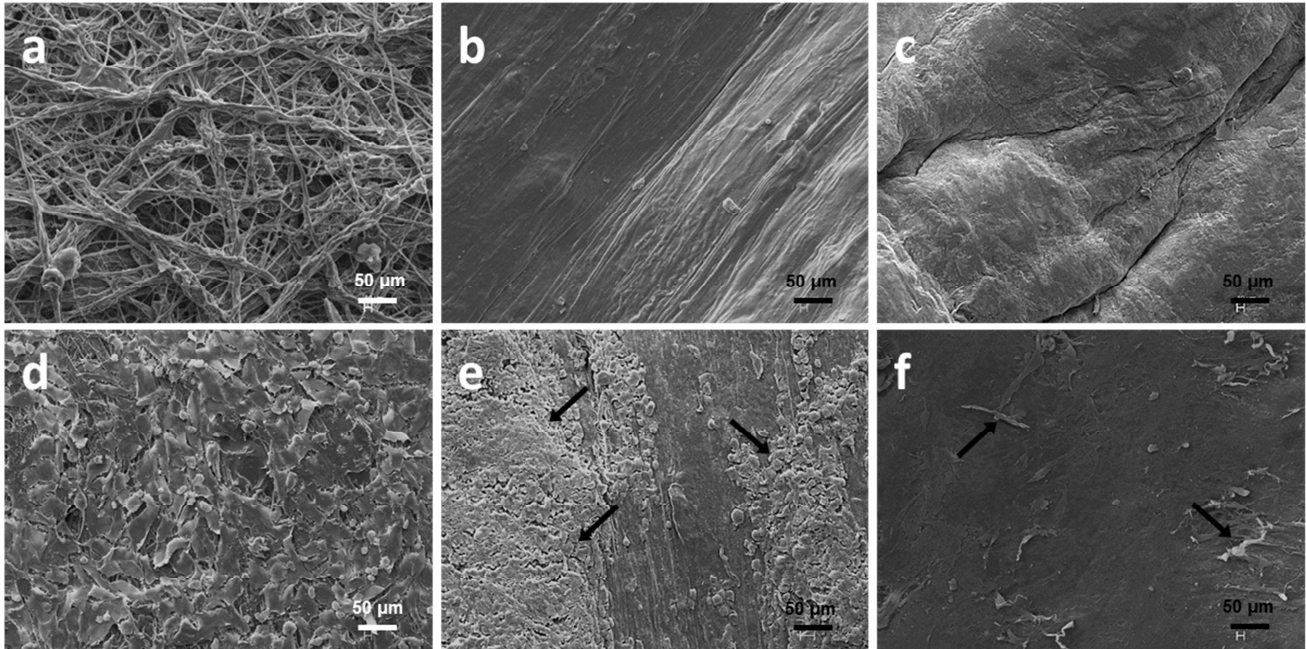
The three scaffold materials for cell seeding compared in this study differ in structure and chemical composition. SEM analysis (Figure 12) of native PU showed a fine meshwork of polyurethane fibres (a), while collagen scaffolds revealed a smooth topography (b). Decellularised veins indicated a smooth surface with cavities of 10 μm to 50 μm (c).

In concert with results from Gulbins *et al.* [23] seeded PU revealed a cobblestone-morphology (d), indicating the presence of ECs coating. Collagen (e) and decellularised veins (f) showed insufficient cell adherence (arrows pointing on attached cells) resulting in widely bare scaffold surfaces.

In contrast to our findings Buttafoca *et al.* [62] could create a complete layer of smooth muscle cells within 7 days. But in difference to our collagen tubes they used a hybrid of the copolymer P(DLLA-coTMC) (D,L-lactide and trimethylene carbonate) and collagen for the purpose to generate a scaffold that is more stable than using collagen alone. So the scaffold possessed a clearly porous surface that might have supported the cells adherence.

Although studies showed promising results in animal experiments with decellularised veins as scaffold [63], these findings might not be adaptive to human beings. The veins may have unknown drawbacks due to the toxic residuals that highly affect cell attachments.

Figure 12. SEM analysis of polyurethane (a), collagen (b) and decellularised vein (c) before (a-c) and after (d-f) rotational seeding. Whilst PU shows cell adherence all over the scaffolds surface (d), collagen (e) and decellularised veins (f) are seeded partially only (arrows). These are representative images of an experiment in triplicates.

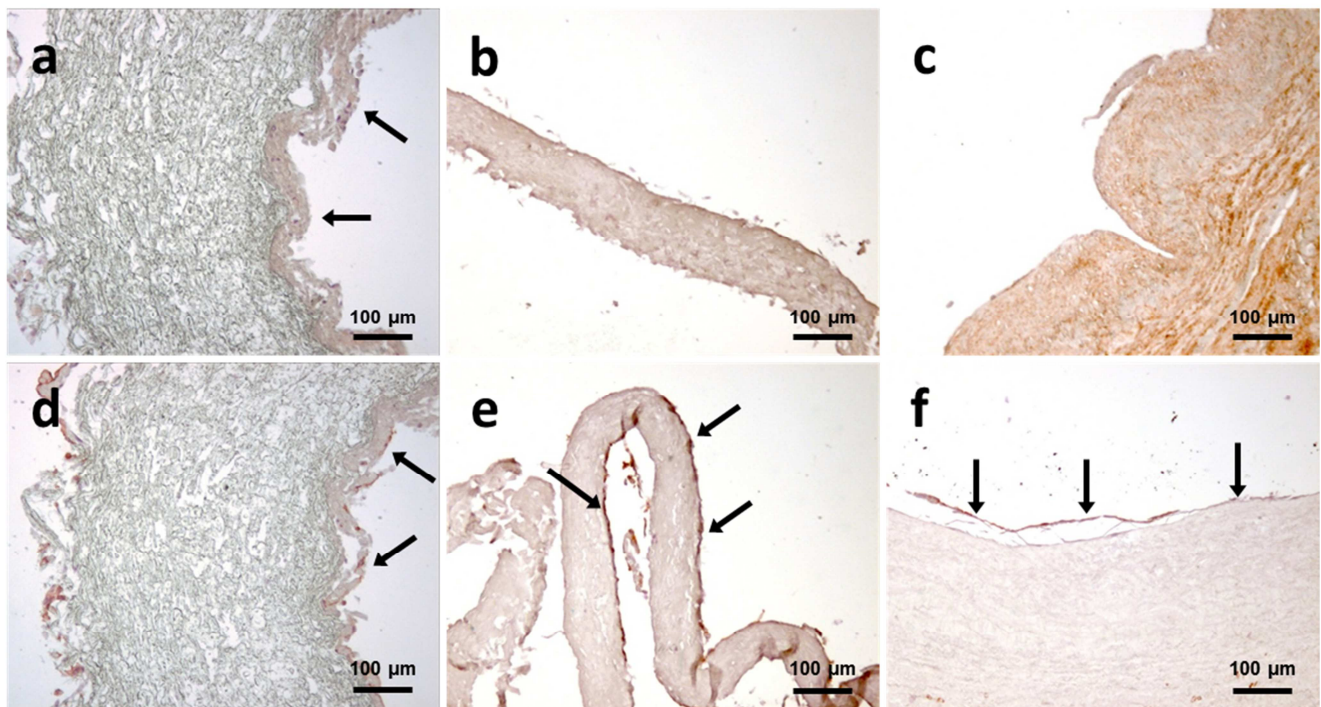


In line with the SEM results, a confluent cell layer was detected on the PU scaffolds using immunohistochemistry. Staining against FB-specific TE-7 revealed a confluent coverage with FB on PU (Figure 13a). The staining for EC-specific CD31 is partial and weak, indicating that ECs lose cell-cell-contacts [64] during static cultivation on PU.

Collagen (b) and decellularised veins (c) did not show positive staining for TE-7 on their surface, indicating the absence of FBs. In contrast, ECs are evenly spread on collagen (d) while only single cells were found on decellularised veins (e), confirming the findings of SEM analysis.

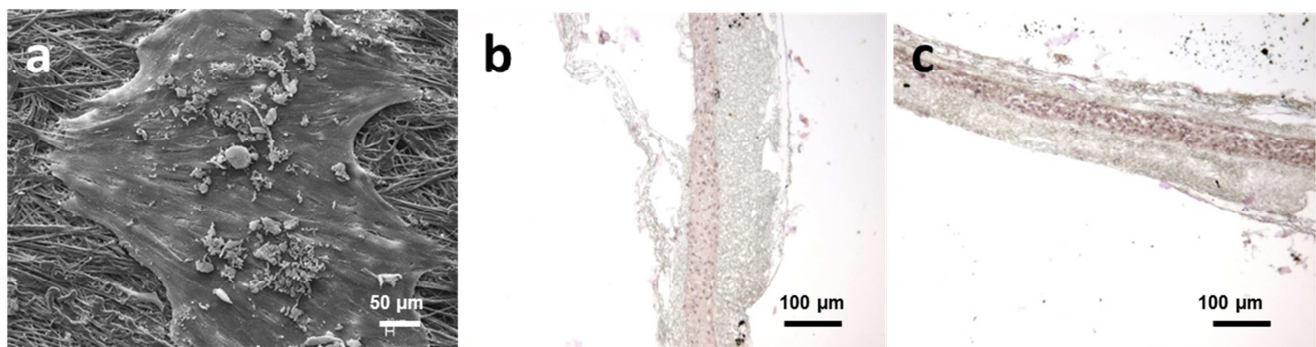
While the porous nature of PU supports cell attachment, the smooth surface of collagen and decellularised veins seem to hamper cell adherence. This might be explained by shear stress during EC-injection to the scaffold's lumen, resulting in the loss of insufficient attached FBs on collagen and decellularised veins.

Figure 13. IHC analysis of dynamically seeded PU, collagen and decellularised vein after EC-specific CD31 (a-c, red) and FB-specific TE-7 (d-f, red) staining. Positively stained cells are highlighted with arrows. Cell nuclei were stained with hemalaun. These are representative images of an experiment in triplicates.



As shown in Figure 14, SEM analysis of seeded PU after preliminary perfusion experiments under pulsatile flow conditions (100 dyn/ cm^2) revealed a disrupted cell layer (a). A closer look showed a smooth cell surface and an orientation in flow direction after dynamic cultivation. IHC analysis demonstrated a partial seeding of PU with slight staining for CD31 (b) and TE-7 (c). Due to these results and the fact that the mean shear stress in small venules tend to be between 20 to 40 dyn/ cm^2 [31], we adapted the perfusion protocol.

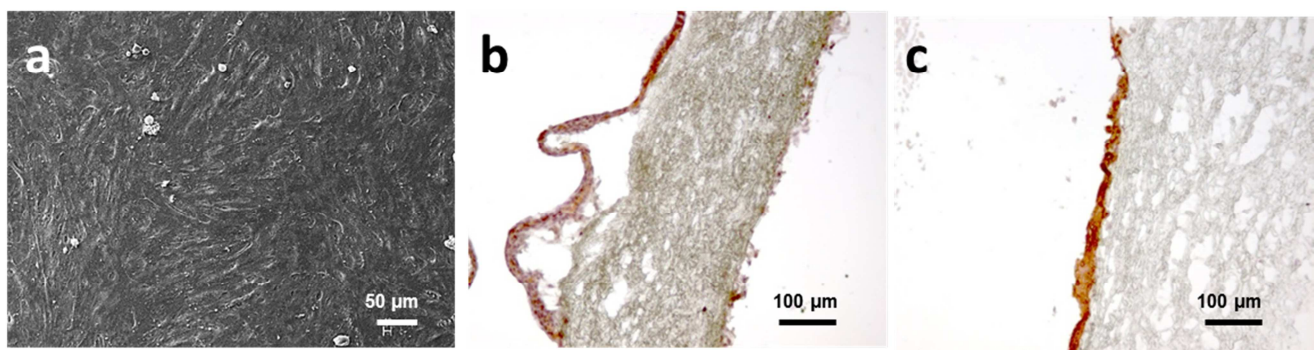
Figure 14. SEM (a) and IHC analysis (b = TE-7, c = CD31) of seeded PU after flow exposure (100 dyn/ cm^2) in the bioreactor system show single cells on the surface of the scaffolds.



Ballermann *et al.* [31] demonstrated, that ECs cultivated for 9 days with 15 dyn/ cm^2 showed a significantly better adherence than cells cultivated under the same conditions with 1 dyn/ cm^2 . In

dependence on this we started conditioning with a shear stress of 10 dyn/ cm² and then increased it stepwise up to 40 dyn/ cm². In contrast to other groups [42,65] we cultivated the cells with an up to 4-fold higher shear stress. As shown in Figure 15, SEM analysis of seeded PU revealed a confluent cellular coating of the scaffolds (a). After flow exposure, the cell layer is flattened and smoother than under static conditions. IHC showed a defined cell multilayer with moderate staining for TE-7 (b) and a high expression of CD31 (c)

Figure 15. SEM (a) and IHC analysis (b =TE-7, c = CD31) of seeded PU after flow exposure (10 to 40 dyn/cm²) in the all-in-one bioreactor system show a confluent and flattened lining with ECs (a, c) and FBs (b). These are representative images of an experiment in triplicates.



4. Conclusions

The new developed BR for the use in a conventional incubator combines seeding and conditioning of two vascular prostheses in a unique fashion. It provides a new tool for simultaneous seeding, conditioning and perfusion of multiple small-diameter TEVGs. This system allows the development of cell-based cardiovascular devices for in-vitro evaluation studies as well.

The results of the first experiments demonstrated a successful and easy sterile process that allows cell evaluation in a period of 5 days. This first proof of concept offers further approaches to a routine application in TEVG laboratory research processes. Future experiments are still required to evaluate the influence of flow and pulse rates on the formation of stable layers on various scaffold materials. Additionally the impact of these parameters on cellular gene expression and scaffolds mechanics has to be assessed.

Acknowledgments

We would like to thank Viscofan Bioengineering GmbH for kind appropriation of collagen tubes.

Author Contributions

Julia Schulte performed all cell culturing experiments, optimised the bioreactor, wrote the manuscript and performed data analyses. Anja Friedrich developed the prototype of the bioreactor and supported the writing of the manuscript. Trixi Hollweck supported the writing of the manuscript and data analyses. Fabian König supported and implemented changes to the bioreactor setup by using a CATIA Software. Markus Eblenkamp supervised the technical construction done by Anja Friedrich. Andres Beiras-Fernandez supported the whole project from a clinical point of view. Cornelia Fano developed and optimised the polyurethane scaffolds. Christian Hagl is the clinical director of the heart surgery who has provided essential clinical input to the project. Bassil Akra conceived the experimental study, was the project owner, the device inventor, the group leader and overall supervisor. All authors read and approved the final manuscript.

Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interest.

1. WHO, (2011) Causes of Death 2008 summary tables, Health statistics and informatics Department: Geneva.
2. Löwel H, (2006) Koronare Herzkrankheit und akuter Myokardinfarkt. Gesundheitsberichterstattung des Bundes. Heft 33.
3. Ku DN, Allen RC, (2006) Vascular Grafts, in The Biomedical Engineering Handbook, Third Edition, Tissue Engineering and Artificial Organs, Brozino JD, CRC Press.
4. Aper T, Haverich A, Teebken O, (2009) New developments in tissue engineering of vascular prosthetic grafts. *Vasa*. 38: 99-122.
5. Takayama T, Hiro T, Hirayama A, (2010) Is angioplasty able to become the gold standard of treatment beyond bypass surgery for patients with multivessel coronary artery disease? Therapeutic strategies for 3-vessel coronary artery disease: OPCAB vs PCI(PCI-Side). *Circ J*. 74: 2744-2749.
6. Sündermann SH, Salzberg SP, (2011) [Renaissance of surgery for coronary artery disease]. *Praxis (Bern 1994)*. 100: 23-28.
7. Daemen J, Boersma E, Flather M, Booth J, Stables R, et al., (2008) Long-term safety and efficacy of percutaneous coronary intervention with stenting and coronary artery bypass surgery for multivessel coronary artery disease: a meta-analysis with 5-year patient-level data from the ARTS, ERACI-II, MASS-II, and SoS trials. *Circulation*. 118: 1146-1154.
8. Guyton RA, (2006) Coronary artery bypass is superior to drug-eluting stents in multivessel coronary artery disease. *Ann Thorac Surg*. 81: 1949-1957.
9. Cohen DJ, Lavelle TA, Van Hout B, Li H, Lei Y, et al., (2012) Economic outcomes of percutaneous coronary intervention with drug-eluting stents versus bypass surgery for patients with left main or three-vessel coronary artery disease: one-year results from the SYNTAX trial. *Catheter Cardiovasc Interv*. 79: 198-209.
10. Cohen DJ, Van Hout B, Serruys PW, Mohr FW, Macaya C, et al., (2011) Quality of life after PCI with drug-eluting stents or coronary-artery bypass surgery. *N Engl J Med*. 364: 1016-1026.
11. Moneta GL, Porter JM, (1995) Arterial substitutes in peripheral vascular surgery: a review. *J Long Term Eff Med Implants*. 5: 47-67.
12. Burkel WE, (1988) The challenge of small diameter vascular grafts. *Med Prog Technol*. 14: 165-175.

13. Peppas NA, Langer R, (1994) New challenges in biomaterials. *Science*. 263: 1715-1720.
14. Zhou M, Liu Z, Liu C, Jiang X, Wei Z, et al., (2012) Tissue engineering of small-diameter vascular grafts by endothelial progenitor cells seeding heparin-coated decellularized scaffolds. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 100: 111-120.
15. Wood SC, Tang X, Tesfamariam B, (2010) Paclitaxel potentiates inflammatory cytokine-induced prothrombotic molecules in endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol*. 55: 276-285.
16. Kannan RY, Salacinski HJ, Butler PE, Hamilton G, Seifalian AM, (2005) Current status of prosthetic bypass grafts: a review. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 74: 570-581.
17. Yazdani SK, Tillman BW, Berry JL, Soker S, Geary RL, (2010) The fate of an endothelium layer after preconditioning. *J Vasc Surg*. 51: 174-183.
18. Kerdjoudj H, Moby V, Berthelemy N, Gentils M, Boura C, et al., (2007) The ideal small arterial substitute: Role of cell seeding and tissue engineering. *Clin Hemorheol Microcirc*. 37: 89-98.
19. Bourget JM, Gauvin R, Larouche D, Lavoie A, Labbe R, et al., (2012) Human fibroblast-derived ECM as a scaffold for vascular tissue engineering. *Biomaterials*. 33: 9205-9213.
20. Gulbins H, Goldemund A, Anderson I, Haas U, Uhlig A, et al., (2003) Preseeding with autologous fibroblasts improves endothelialization of glutaraldehyde-fixed porcine aortic valves. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 125: 592-601.
21. DiMuzio P, Fischer L, McIlhenny S, DiMatteo C, Golezorki N, et al., (2006) Development of a tissue-engineered bypass graft seeded with stem cells. *Vascular*. 14: 338-342.
22. Kawamoto A, Asahara T, (2007) Role of progenitor endothelial cells in cardiovascular disease and upcoming therapies. *Catheter Cardiovasc Interv*. 70: 477-484.
23. Gulbins H, Pritisanac A, Dauner M, Petzold R, Goldemund A, et al., (2006) Seeding of human vascular cells onto small diameter polyurethane vascular grafts. *Thorac Cardiovasc Surg*. 54: 102-107.
24. Alison MR, Poulsom R, Forbes S, Wright NA, (2002) An introduction to stem cells. *J Pathol*. 197: 419-423.
25. Martin-Rendon E, Watt SM, (2003) Exploitation of stem cell plasticity. *Transfus Med*. 13: 325-349.
26. Ringe J, Kaps C, Burmester GR, Sittlinger M, (2002) Stem cells for regenerative medicine: advances in the engineering of tissues and organs. *Naturwissenschaften*. 89: 338-351.
27. Zimmermann WH, Eschenhagen T, (2003) Cardiac tissue engineering for replacement therapy. *Heart Fail Rev*. 8: 259-269.
28. Petit-Zeman S, (2001) Regenerative medicine. *Nat Biotechnol*. 19: 201-206.
29. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, et al., (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284: 143-147.
30. Matsumura G, Hibino N, Ikada Y, Kurosawa H, Shin'oka T, (2003) Successful application of tissue engineered vascular autografts: clinical experience. *Biomaterials*. 24: 2303-2308.
31. Ballermann BJ, Dardik A, Eng E, Liu A, (1998) Shear stress and the endothelium. *Kidney Int Suppl*. 67: S100-108.
32. Solan A, Dahl SL, Niklason LE, (2009) Effects of mechanical stretch on collagen and cross-linking in engineered blood vessels. *Cell Transplant*. 18: 915-921.
33. Barron V, Lyons E, Stenson-Cox C, McHugh PE, Pandit A, (2003) Bioreactors for cardiovascular cell and tissue growth: a review. *Ann Biomed Eng*. 31: 1017-1030.
34. Lee DJ, Steen J, Jordan JE, Kincaid EH, Kon ND, et al., (2009) Endothelialization of heart valve matrix using a computer-assisted pulsatile bioreactor. *Tissue Eng Part A*. 15: 807-814.
35. Chen HC, Hu YC, (2006) Bioreactors for tissue engineering. *Biotechnol Lett*. 28: 1415-1423.
36. Morsi YS, Yang WW, Owida A, Wong CS, (2007) Development of a novel pulsatile bioreactor for tissue culture. *J Artif Organs*. 10: 109-114.
37. Wendt D, Riboldi SA, Cioffi M, Martin I, (2009) Bioreactors in tissue engineering: scientific challenges and clinical perspectives. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. 112: 1-27.

38. Chlupac J, Filova E, Bacakova L, (2009) Blood vessel replacement: 50 years of development and tissue engineering paradigms in vascular surgery. *Physiol Res.* 58 Suppl 2: S119-139.
39. Rademacher A, Paulitschke M, Meyer R, Hetzer R, (2001) Endothelialization of PTFE vascular grafts under flow induces significant cell changes. *Int J Artif Organs.* 24: 235-242.
40. Martin I, Smith T, Wendt D, (2009) Bioreactor-based roadmap for the translation of tissue engineering strategies into clinical products. *Trends Biotechnol.* 27: 495-502.
41. Bilodeau K, Couet F, Boccafroschi F, Mantovani D, (2005) Design of a perfusion bioreactor specific to the regeneration of vascular tissues under mechanical stresses. *Artif Organs.* 29: 906-912.
42. Dunkern TR, Paulitschke M, Meyer R, Buttemeyer R, Hetzer R, et al., (1999) A novel perfusion system for the endothelialisation of PTFE grafts under defined flow. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 18: 105-110.
43. Heydarkhan-Hagvall S, Esguerra M, Helenius G, Soderberg R, Johansson BR, et al., (2006) Production of extracellular matrix components in tissue-engineered blood vessels. *Tissue Eng.* 12: 831-842.
44. Sodian R, Lemke T, Fritsche C, Hoerstrup SP, Fu P, et al., (2002) Tissue-engineering bioreactors: a new combined cell-seeding and perfusion system for vascular tissue engineering. *Tissue Eng.* 8: 863-870.
45. Williams C, Wick TM, (2004) Perfusion bioreactor for small diameter tissue-engineered arteries. *Tissue Eng.* 10: 930-941.
46. Arrigoni C, Chitto A, Mantero S, Remuzzi A, (2008) Rotating versus perfusion bioreactor for the culture of engineered vascular constructs based on hyaluronic acid. *Biotechnol Bioeng.* 100: 988-997.
47. Engbers-Buijtenhuijs P, Buttafoco L, Poot AA, Dijkstra PJ, de Vos RA, et al., (2006) Biological characterisation of vascular grafts cultured in a bioreactor. *Biomaterials.* 27: 2390-2397.
48. Hahn MS, McHale MK, Wang E, Schmedlen RH, West JL, (2007) Physiologic pulsatile flow bioreactor conditioning of poly(ethylene glycol)-based tissue engineered vascular grafts. *Ann Biomed Eng.* 35: 190-200.
49. Aleksieva G, Hollweck T, Thierfelder N, Haas U, Koenig F, et al., (2012) Use of a special bioreactor for the cultivation of a new flexible polyurethane scaffold for aortic valve tissue engineering. *Biomed Eng Online.* 11: 92.
50. Huang AH, Niklason LE, (2011) Engineering biological-based vascular grafts using a pulsatile bioreactor. *J Vis Exp.*
51. Thompson CA, Colon-Hernandez P, Pomerantseva I, MacNeil BD, Nasser B, et al., (2002) A novel pulsatile, laminar flow bioreactor for the development of tissue-engineered vascular structures. *Tissue Eng.* 8: 1083-1088.
52. Massai D, Cerino G, Gallo D, Pennella F, Deriu MA, et al., (2013) Bioreactors as engineering support to treat cardiac muscle and vascular disease. *J Healthc Eng.* 4: 329-370.
53. Peterson A, Landeen LK, Bennett J, Gee G, Chesla S, et al., (2000) Apparatus and method for simulating in vivo conditions while seeding and culturing three-dimensional tissue constructs., in *Advanced Tissue Sciences, Inc.*
54. Hsu SH, Tsai IJ, Lin DJ, Chen DC, (2005) The effect of dynamic culture conditions on endothelial cell seeding and retention on small diameter polyurethane vascular grafts. *Med Eng Phys.* 27: 267-272.
55. Akra B, Uhlig A, Haas U, Fano C, Dauner M, et al., (2009) Perfusion Bioreactor: A New Pulsatile System for the Perfusion of Tissue Engineered Cardiovascular Prostheses; World Congress on Medical Physics and Biomedical Engineering, September 7 - 12, 2009, Munich, Germany, Magjarevic R, Springer Berlin Heidelberg.
56. Peck M, Gebhart D, Dusserre N, McAllister TN, L'Heureux N, (2011) The Evolution of Vascular Tissue Engineering and Current State of the Art. *Cells Tissues Organs.*

57. Feugier P, Black RA, Hunt JA, How TV, (2005) Attachment, morphology and adherence of human endothelial cells to vascular prosthesis materials under the action of shear stress. *Biomaterials*. 26: 1457-1466.
58. Ballard VL, Sharma A, Duignan I, Holm JM, Chin A, et al., (2006) Vascular tenascin-C regulates cardiac endothelial phenotype and neovascularization. *FASEB J*. 20: 717-719.
59. Corda S, Samuel JL, Rappaport L, (2000) Extracellular matrix and growth factors during heart growth. *Heart Fail Rev*. 5: 119-130.
60. Hallmann R, Horn N, Selg M, Wendler O, Pausch F, et al., (2005) Expression and function of laminins in the embryonic and mature vasculature. *Physiol Rev*. 85: 979-1000.
61. Laflamme K, Roberge CJ, Grenier G, Remy-Zolghadri M, Pouliot S, et al., (2006) Adventitia contribution in vascular tone: insights from adventitia-derived cells in a tissue-engineered human blood vessel. *FASEB J*. 20: 1245-1247.
62. Buttafoco L, Boks NP, Engbers-Buijtenhuijs P, Grijpma DW, Poot AA, et al., (2006) Porous hybrid structures based on P(DLLA-co-TMC) and collagen for tissue engineering of small-diameter blood vessels. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*. 79: 425-434.
63. Teebken OE, Pichlmaier AM, Haverich A, (2001) Cell seeded decellularised allogeneic matrix grafts and biodegradable polydioxanone-prostheses compared with arterial autografts in a porcine model. *Eur J Vasc Endovasc Surg*. 22: 139-145.
64. Newman PJ, (1994) The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci*. 714: 165-174.
65. McIlhenny SE, Hager ES, Grabo DJ, DiMatteo C, Shapiro IM, et al., (2010) Linear shear conditioning improves vascular graft retention of adipose-derived stem cells by upregulation of the alpha5beta1 integrin. *Tissue Eng Part A*. 16: 245-255.